

PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



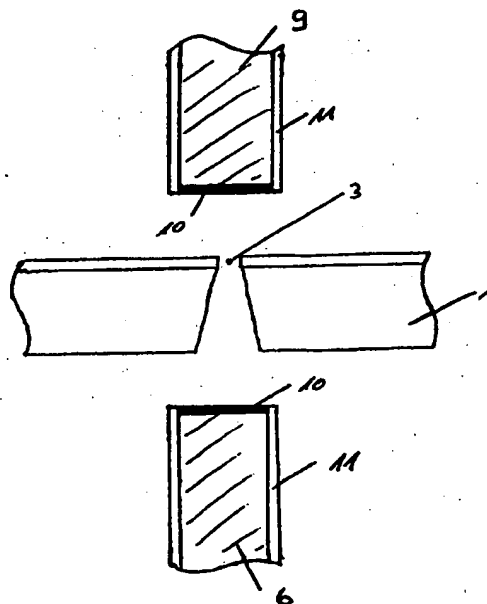
(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 33/487, C12M 1/34, G01N 33/483	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/31503 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 24. Juni 1999 (24.06.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/IB98/01150 (22) Internationales Anmeldedatum: 28. Juli 1998 (28.07.98) (30) Prioritätsdaten: 2903/97 17. Dezember 1997 (17.12.97) CH (71)(72) Anmelder und Erfinder: VOGEL, Horst [DE/CH]; Chemin du Closelat 2, CH-1028 Préverenges (CH). SCHMIDT, Christian [DE/CH]; Chemin de la Cocarde 11, CH-1024 Ecublens (CH). (74) Anwalt: E. BLUM & CO.; Vorderberg 11, CH-8044 Zürich (CH).	(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	

(54) Title: **POSITIONING AND ELECTROPHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF INDIVIDUAL CELLS AND RECONSTITUTED MEMBRANE SYSTEMS ON MICROSTRUCTURED CARRIERS**

(54) Bezeichnung: **POSITIONIERUNG UND ELEKTROPHYSIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG EINZELNER ZELLEN UND REKONSTITUIERTER MEMBRANSYSTEME AUF MIKROSTRUKTURIERTEN TRÄGERN**

(57) Abstract

The invention relates to a measuring device which permits a very simple positioning of cells and vesicles respective of cell membranes on planar carriers. The invention also relates to a corresponding highly efficient method for the positioning and electric characterization of such membranes with a consistently high signal-to-noise ratio. In addition, statements concerning interactions of substances with lipid membranes respective of materials bonded thereon or therein respective of signal transduction mechanisms connected thereto are possible.



(57) Zusammenfassung

Es wird eine Messvorrichtung beschrieben, die eine sehr einfache Positionierung von Zellen und Vesikeln resp. Zellmembranen auf planaren Trägern gestattet sowie ein entsprechendes hocheffizientes Verfahren zur Positionierung und elektrischen Charakterisierung solcher Membranen mit konsistent hohem Signal-Rausch-Verhältnis. Damit sind Aussagen über Wechselwirkungen von Substanzen mit Lipidmembranen resp. darauf oder darin gebundener Stoffe, resp. damit im Zusammenhang stehender Signaltransduktionsmechanismen möglich.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Positionierung und elektrophysiologische Charakterisierung einzelner Zellen und rekonstituierter Membransysteme auf mikrostrukturierten Trägern

5

Verwandte Anmeldungen

Diese Anmeldung beansprucht die Priorität der Schweizer Anmeldung Nr. 2903/97, die am 17. Dezember 1997 hinterlegt wurde.

Technisches Gebiet

10

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Mes-
sanordnung sowie ein Positionierverfahren für Zellen und
Vesikel resp. Lipidmembranen, das Untersuchungen an Mem-
branen ermöglicht, insbesondere ein elektrophysiologi-
sches Verfahren zur Untersuchung von kanalbildenden Pro-
teinen und mittels kanalbildender Proteine oder an kanal-
bildende Proteine gekoppelten Rezeptoren über die gemes-
sene elektrische Eigenschaft der kanalbildenden Proteine.
Insbesondere betrifft das erfindungsgemässe Messverfahren
ein (Multiarray-) Patch-clamp Verfahren, welches die Emp-
findlichkeit und Selektivität der klassischen Patch-
clamp-Technik besitzt, gleichzeitig aber infolge des
ebenfalls erfindungsgemässen Verfahrens der Positionie-
rung von biologischen Zellen oder Vesikeln auf mi-
krostrukturierten Trägern eine einfachere Herstellung der
Patch-Membranen sowie hohen Signal-Rauschabstand gestat-
tet. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung eine Mes-
sanordnung, die sowohl für die Positionierung als auch
für die elektrophysiologische Messung geeignet ist.

30

Stand der Technik

Viele biologisch wichtige Signaltransdukti-
onsprozesse wie z.B. Nervenleitung, ereignen sich auf
oder in Zellmembranen. Es ist deshalb nicht überraschend,

- dass die biologischen Funktionen von Membranproteinen im allgemeinen, und von Neurorezeptoren im besonderen durch pharmakologisch aktive Wirkstoffe beeinflusst werden (J.-P. Changeux (1993). "Chemical signalling in the brain". Sci. Am. Nov. Seiten 30 ff; A.G. Gilman (1995). Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 34: 1406-1428; M. Rodbell (1995). Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 34: 1420-1428).

Das funktionelle Verständnis der molekularen Wechselwirkungen an Rezeptoren sowie der Einsatz solcher Rezeptoren beim Wirkstoffscreening spielen in der modernen Arzneimittellentwicklung eine zentrale Rolle. Mit der steigenden Zahl der bekannten Zielrezeptoren (auch Target-Rezeptoren genannt) für Wirkstoffe und der schnell anwachsenden Zahl von potentiellen Wirkstoffen aus der kombinatorischen Chemie, wächst der Bedarf an hochempfindlichen Screeningmethoden, die es erlauben eine grosse Zahl von verschiedenen Substanzen bei hohem zeitlichem Durchsatz zu analysieren ("high through-put screening" = HTS).

Gegenwärtig folgt man beim pharmakologischen Wirkstoffscreening noch relativ traditionellen Wegen, indem zeitaufwendige Ligandenbindungstests und Rezeptorfunktionstests getrennt durchgeführt werden (J. Hodgson (1992) Bio/Technology 9: 973). Andererseits zählen Membranproteine wie die an G-Proteine gekoppelten Rezeptoren und die kanalbildenden Rezeptoren zu den wichtigsten Zielproteinen für aktive Wirkstoffe (J. Knowles (1997) "Medicines for the new millennium hunting down diseases" Odyssey Vol. 3 (1)). In diesem Zusammenhang werden immer noch klassische Patch-clamp Methoden als funktionelle Rezeptortests eingesetzt. Der Vorteil dieser elektrophysiologischen Methode liegt darin, dass die Funktion der entsprechenden kanalbildenden oder an kanalbildende Proteine gekoppelten Rezeptoren über die gemessenen elektrischen Eigenschaften der kanalbildenden Proteine direkt zugänglich ist. Die Methode ist hochspezifisch und extrem empfindlich - man kann im Prinzip die Kanalaktivität einzel-

ner Rezeptormoleküle messen. Dabei werden Glasmikropipetten mit einem Öffnungsdurchmesser von typischerweise 1-0,1 µm auf die Oberfläche einer biologischen Zelle aufgesetzt. Die Membranfläche, die von der Mikropipette abgedeckt wird, nennt man "Patch". Wenn der Kontakt zwischen der Glaselektrode und der Zellmembranoberfläche elektrisch hinreichend isolierend ist, kann mit Hilfe von Mikroelektroden, die einerseits in der Glaspipette und andererseits im membrangegenüberliegenden Milieu platziert sind, der Ionenstrom über den Membranpatch elektrisch gemessen werden (O.P. Hamill, A. Marty, et al. (1981).

"Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." Pflugers Arch 391(2): 85-100).

Im Zusammenhang mit Wirkstoffscreening weist die traditionelle Patch-clamp Technik allerdings auch entscheidende Nachteile auf. Patch-clamp Messungen sind äusserst zeitaufwendig, erfordern speziell geschultes Personal mit langen Erfahrungen auf diesem Gebiet und sind für HTS praktisch nicht einsetzbar.

Ziel der vorliegenden Erfindung war es deshalb ein Mess- und Positionierverfahren bereitzustellen, das einfach in der Handhabung ist und rasche Untersuchung erlaubt, insbesondere für eine (Multiarray-)Patch-Clamp Methode, welche die Empfindlichkeit und Selektivität der klassischen Patch-Clamp Technik besitzt, gleichzeitig aber deren Nachteile infolge der erfindungsgemässen Methode der automatischen Positionierung von biologischen Zellen oder Vesikeln resp. entsprechender Lipidmembranen sowie der spezifischen Oberflächeneigenschaften der Messanordnung eliminiert. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung eine planare Positionier- und Messanordnung, die für die Ausführung der erfindungsgemässen Verfahren speziell geeignet ist.

Darstellung der Erfindung

Die erfindungsgemässen Verfahren zeichnen sich aus durch äusserste Einfachheit in der Herstellung elektrisch abdichtender Patchmembranen sowie bei der anschliessenden Messung; in Kombination mit modernen mikro-
5 technologischen Methoden bietet die neue Technologie alle Möglichkeiten für den Einsatz im "high trough-put screening" (HTS). Ausserdem eignen sich die erfindungsgemässe Positionier- resp. Messanordnung sowie die erfindungsge-
10 mässen Verfahren zur Kombination von elektrischen und optischen Messungen, durch die an diesen mittels des erfindungsgemässen Positionierverfahrens erhaltenen planaren Membranen neue wichtige Informationen über die zu untersuchenden Rezeptoren erhalten werden können.

15 Das erfindungsgemässe Positionierverfahren für Zellen und Vesikel, resp. entsprechender Lipidmembranen zeichnet sich dadurch aus, dass zwischen zwei Elektroden eine Trennwand aus elektrisch isolierendem Material, in der Folge als Träger bezeichnet, angeordnet ist.
20 Der Träger weist eine Apertur auf sowie eine Oberfläche, an der die Membranen fixiert werden. Der Träger muss nicht aus einem Stück bestehen, sondern er kann z.B. aufgebaut sein aus einem Halter, auf dem das für die Membranbindung und Membranpositionierung eigentlich relevante
25 Material befestigt oder in den dieses Material eingelassen ist, wobei dieses Material für die Bindung resp. Positionierung der Membranen mindestens eine Apertur aufweist. Die Fixierung der Membranen kann z.B. auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen einer beispielsweise
30 negativ geladenen Membranoberfläche und einer positiv geladenen Trägeroberfläche beruhen. Falls die Trägeroberfläche als solche nicht die gewünschte Ladung aufweist, so kann sie entsprechend modifiziert werden. Es hat sich gezeigt, dass Zellen und Vesikel sehr gut positionierbar
35 sind, wenn sie als Suspension über eine Zugabeöffnung von üblicherweise 0,2 - 2 mm Durchmesser, bevorzugt 0,5 - 1 mm in der einen Elektrode oder über einen nahe der Aper-

tur angebrachten Schlauch oder mittels einer Pipette in die Apparatur gegeben werden, wobei die beiden jeweils oberhalb und unterhalb des Trägers angeordneten Elektroden eine solche elektrische Potentialdifferenz aufweisen, dass Zellen resp. Vesikel elektrophoretisch auf die Apertur zubewegt werden. Die Zugabeöffnung kann von beliebiger Form sein, üblicherweise ist sie aber ellipsenförmig, insbesondere kreisförmig, so dass sie sich z.B. konzentrisch über der Apertur anordnen lässt.

10 Die Fixierung des Trägers zwischen den Elektroden kann dadurch erfolgen, dass zwischen der jeweiligen Elektrode und dem Träger je ein Abstandhalter vorgesehen wird, der, ebenso wie der Träger selbst, aus elektrisch isolierendem Material besteht und Kanäle aufweist, 15 die zwischen der Apertur und der Elektrode angeordnet sind und mit diesen in Kontakt stehen. Mit leitfähiger Lösung gefüllt können diese Kanäle als Referenz resp. Probekammer dienen. Dabei hat es sich als günstig erwiesen, wenn die Referenzkammer so geringe Ausmasse aufweist, dass die darin enthaltene Referenzpufferlösung 20 durch Kapillarkräfte darin fixiert ist. Im Extremfall ist es möglich, das Referenzvolumen ohne physische Begrenzungen und nur über Kapillarkräfte zwischen Chip und Elektrode zu fixieren. Das Probenkompartiment (die Probenkammer) bildet sich zwischen der Chipoberfläche und der Zugabe-Elektrode aus. Es hat keine seitliche Begrenzung sondern wird durch Kapillarkräfte gehalten. Im Sinne einer Integration dieser Methode ist es aber auch möglich eine Probenkammer mit seitlichen Begrenzungen aufzubauen. 25 Die Messanordnung der vorliegenden Erfindung umfasst Ausführungsformen mit Probenkammern sowohl ohne als auch mit physischen seitlichen Begrenzungen.

Da es je nach angestrebter Analyse sinnvoll ist, die Membran beidseitig mit Messlösung in Kontakt zu 35 bringen, kann eine Zugabe eines zu untersuchenden Stoffes selbstverständlich auf von der üblicherweise als Referenzseite dienenden Seite her erfolgen. Auch kann z.B.

ein Referenzpuffer in ein pastöses Gel eingebracht werden, wodurch ein Austausch der ausserhalb des Gels liegenden Flüssigkeit möglich wird, ohne den im Gel gespeicherten Referenzpuffer in seiner Zusammensetzung zu verändern. Als solche Gele eignen sich beispielsweise Agarose und Polyacrylamid.

Das erfindungsgemässe Messverfahren erlaubt insbesondere die Messung von Ionenkanalströmen auf zuverlässige und reproduzierbare Weise und dies mit einem hohen Signal-Rauschabstand. Grundlage dafür ist die genaue Positionierung und anschliessende elektrisch dichte Bindung von Vesikeln, Zellen oder anderen biologischen Organellen, resp. Membranen entsprechenden Ursprungs, an mikrostrukturierten Öffnungen (im folgenden auch als Apertur bezeichnet) mit einem Durchmesser $d_M < 15 \mu\text{m}$, vorzugsweise $< 10 \mu\text{m}$, insbesondere $0,3 - 7 \mu\text{m}$, speziell bevorzugt $0,3 - 5 \mu\text{m}$ und ganz speziell bevorzugt $1 - 5 \mu\text{m}$. Die elektrisch dichte Bindung der Vesikel bzw. Zellen resp. deren Membranen wird durch eine starke elektrostatische Anziehung zwischen der Trägeroberfläche und der Membranoberfläche erreicht.

Für das erfindungsgemässe Verfahren hat es sich als günstig erwiesen, wenn die Membran auf einen möglichst planaren Träger aufgebracht wird. Ein entsprechender Träger kann aus diversen Materialien bestehen; Vorteilhaft für geeignete Materialien ist aber, dass sie vorzugsweise nicht nur mikroskopisch flach sondern molekular relativ eben sind. Zudem müssen geeignete Materialien im System inert, nicht leitend und vorzugsweise chemisch modifizierbar sein.

Als speziell geeignet herausgestellt haben sich mikrostrukturierte Silizium/Siliziumoxyd bzw. Silizium/Siliziumoxynitrid Träger, die, für die Bereitstellung einer guten elektrostatischen Anziehung, mit einer die gewünschte Oberflächenladung verleihenden Substanz beschichtet sind. Geeignet sind beispielsweise Polykationen, wie von Mazia, Schatten et al. beschrieben (siehe D.

Mazia, G. Schatten et al. (1975). "Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine." J. Cell. biol. 66: 198-200). Solche Polykationen sind beispielsweise Poly-L-Lysin und Polyethylenimin.

5 Bei der Auswahl geeigneter Trägerchipmaterialien selbst ist, wie bereits oben erwähnt, auf eine ausreichende Modifizierbarkeit der Oberfläche zu achten, damit eine elektrostatische oder gegebenenfalls van der Waals oder kovalente Bindung von Vesikeln oder biologischen Zellen resp. entsprechender Membranen oder Membranfragmente, daran möglich ist. Zudem ist eine Bindung aufgrund hydrophob- hydrophiler Wechselwirkungen unter bestimmten Umständen möglich (Radler, J., H. Strey, et al. (1995). "Phenomenology and Kinetics Of Lipid Bilayer Spreading On Hydrophilic Surfaces." Langmuir 11(11): 15 4539-4548). Ferner muss das Trägermaterial bearbeitbar, d.h. mit einer Apertur resp. einem Fenster gewünschter Grösse versehbar sein und eine Fokussierung des elektrischen Feldes auf die Aperturöffnung ermöglichen.

20 Ein speziell geeigneter Träger ist ein Si/SiO₂-bzw. Silizium/Siliziumoxynitrid-Chip, der aus handelsüblichen Si-Wafern mit einer Oxidschicht einer Dicke D von üblicherweise > 200 nm herstellbar ist. Ein solcher Träger lässt sich leicht mikrostrukturieren. Nach 25 beispielsweise Fotolithographie, bzw. bei Aperturen von d < 1,5 µm Elektronenstrahlolithographie, können die Strukturen durch anisotropes Ätzen des Siliziums in KOH-haltigem Medium sowie reaktives Ionenätzen der Quarzschicht gewonnen werden. Neben Quarz bilden auch Glas- 30 schichten, feste oder gelartige Polymere etc. geeignete modifizierbare Oberflächen aus. Weiterhin eignen sich beispielsweise Plastomere und Elastomere wie Polyimide, Polymethylmetacrylate, Polycarbonate, Silicagele wie Sylgard, etc.

35 Wesentlich an solchen Strukturen ist die Grösse der Apertur, welche < 15 µm betragen sollte, meist < 10 µm, insbesondere < 7 µm und bevorzugt < 5 µm, sowie

die Grösse des Fensters in der Oberflächenschicht, z.B. dem Quarz, welches vorzugsweise $< 50 \mu\text{m}$ ist, im Idealfall aber auf die Grösse der Apertur reduziert ist, um unter bestimmten Umständen (geringe Pufferleitfähigkeit) eine starke Fokussierung des elektrischen Feldes auf die Aperturöffnung zu unterstützen, aber vor allem um mechanische Spannungen (Bruchgefahr) zu reduzieren. Eine starke elektrische Fokussierung entsprechend der starken Inhomogenität des E - Feldes (Betrag E nimmt mit Annäherung an die Apertur zu) erlaubt mit $F_{\text{elektrisch}} \sim E$ (F = Kraftvektor, E = elektrisches Feld) eine entsprechend genaue Bewegung der Vesikel auf die Apparatur. Selbstverständlich kann ein Träger viele Aperturen enthalten, die sequentiell oder parallel für Messungen genutzt werden.

Ein planarer, mit mindestens einer Apertur versehener Trägerchip wird zwischen zwei Elektroden gegeben. Geeignete Elektroden sind z.B. Ag/AgCl, Pt; infolge ihrer leichten Herstellbarkeit werden aber Ag/AgCl-Elektroden bevorzugt. Die Elektroden dienen neben der Spannungsklammerung (voltage clamp) insbesondere auch der Positionierung der Vesikel und Zellen resp. entsprechender Membranen. Die Elektroden befinden sich üblicherweise im Abstand von 0,5 bis 3 mm, meist 0,5 - 1 mm vom Träger, können aber auch weiter entfernt sein. Eine symmetrische Anordnung ist bevorzugt aber nicht notwendig.

Durch einen planaren und in der Vertikalen leicht realisierbaren optisch transparenten Aufbau, z.B. bei Verwendung planarer punktierter Elektroden, bzw. ausserhalb der durch die Apertur hindurch gehenden Vertikalen angeordneter Punktelektroden, eignet sich das oben beschriebene System für simultane elektrische und optische (Fluoreszenz) Messungen. Durch neue Fluoreszenztechniken, wie die Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie und die konfokale CCD-Beobachtung, ist die optische Detektion von Liganden-Bindungen an einzelne Rezeptoren möglich geworden. Die Kombination solcher optischer Techniken mit der hier vorgestellten Methode erlaubt erstmalig die Un-

terscheidung bzw. Auflösung von Liganden-Bindungsereignissen und Kanalaktivitäten. Damit können beispielsweise wichtige Informationen über die Stabilisierung von Konformationsänderungen des Rezeptors durch die Liganden-Bindung und über die funktionelle Verschiedenheit der Liganden-Bindungsplätze im Rezeptor gewonnen werden. (J. Edelstein, O. Schaad, J.-P. Changeux (1997). "Single Binding versus Single Channel Recordings: A new Approach to Study Ionotropic Receptors", Biochemistry 36: 13755-13760). Solche Ergebnisse sind wichtig für das Verständnis der Wirkungsweise von Agonisten und Antagonisten und damit für die Entwicklung neuer Medikamente.

Die vielfältige Anwendbarkeit der erfindungsgemässen Messvorrichtung lässt sich durch Multiarray-Auslegung noch verbessern. Durch Mikrostrukturierung lassen sich auf kleinstem Raum diverse Aperturen anbringen, die entweder an die gleichen Elektroden gekoppelt sind, oder aber getrennte Messkompartimente darstellen, da z.B. Ag/AgCl-Elektroden ebenfalls leicht mikrostrukturierbar sind.

Ferner ist es möglich die erfindungsgemässe Messanordnung mit Vorrichtungen für die Probenzugabe und den Probenaustausch, für die Probenauftrennung und die Regulierung der Messung zu koppeln, z.B. durch Verbindung der Kompartimente über Schläuche mit einem Pumpsystem oder einer Vorrichtung die mittels hydrostatischer Druckdifferenzen oder Piezotropfenverfahren resp. Tintenstrahlverfahren oder Kontakttransferverfahren oder elektroosmotischen Verfahren oder temperaturkontrollierten Verfahren oder Kapillarelektrophorese (CE) oder HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) funktioniert.

Die Messung kann durch Zugabe von membranaktiven Stoffen beeinflusst werden, z.B. durch Zugabe von Porenbildnern, Proteoliposomen und Membranproteinen.

Die Erfindung wird in der Folge anhand der Figuren näher erläutert.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Figur 1 ist eine schematische, nicht massstabgetreue und nicht detailgetreue Darstellung eines aus Si/SiO₂ hergestellten Trägerchips.

5 Figur 2 ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme einer in die SiO₂-Schicht geätzten Aperturöffnung in verschiedenen Ansichten: (A) Apertur von der SiO₂ Oberflächenseite aufgenommen (B) Apertur von der Si - Seite aufgenommen (C) Überblick SiO₂-Seite (D) Überblick
10 anisotrop geätzte Si - Seite

Figur 3 ist eine schematische, nicht massstabgetreue und nicht detailgetreue Darstellung des Messaufbaus mit planparallelen Elektroden im Schnitt.

Figur 4 ist eine schematische, nicht massstabgetreue und nicht detailgetreue Darstellung des Messaufbaus mit Punkt- bzw. Draht-Elektroden im Schnitt.
15

Figur 5 zeigt Rhodamin-markierte Vesikel (Membran in Natura rot, auf Bild hellgrau) nach 24 Stunden Reinigung, bei welcher die Anzahl kleiner Vesikel ($d < 5 \mu\text{m}$) gegenüber der ungereinigten Lösung stark reduziert wurde. Die Vesikel enthalten 200 mM Sorbitollösung, die mit Carboxyfluorescein (in Natura grün, auf Bild mittelgrau) fluoreszenzmarkiert ist.
20

Figur 6 zeigt Vesikel nach der Bindung an Poly-L-Lysin beschichtete Oberflächen, ausgezogen zu sehr flachen Gebilden, die keine Carboxyfluorescein Fluoreszenz aufweisen.
25

Figur 7 zeigt einen Querschnitt durch fusionierte Vesikel, mit einem Kalibrierbalken von 5 μm Länge.

30 Figur 8 zeigt eine Finite Elemente Simulation (FEM) der elektrischen Feldverteilung um einen Chip mit 4 μm Apertur zwischen parallelen Elektroden. Als Parameter wurden verwendet: $c_{\text{Puffer}} = 10 \text{ mM KCl}$, $d_{\text{Apertur}} = 4 \mu\text{m}$ und Abstand Chipapertur(4) - Elektrode(6,9) = 1 mm. Die Äquipotentiallinien haben einen Abstand von 4 mV, wobei die Potentialdifferenz zwischen den Elektroden 80 mV beträgt.
35 Der Feldlinienverlauf ist in dieser Simulation durch die

Annahme von Leckströmen im Randbereich des Trägerchips ellipsenförmig verzerrt (normal: kreisrund).

Figur 9 zeigt den zeitlichen Verlauf der Vesikelbindung und der Ausbildung einer Membran mit sehr hohem elektrischem Abdichtwiderstand bei einer Apertur von 4 μm (Figur 9A) und 7 μm (Figur 9B), sowie 10 mM KCl, einer Klemmspannung von -80 mV und PLL beschichteter SiO_2 Oberfläche (PLL = Poly-L-Lysinbromid).

Figur 10 zeigt den Durchgang von Vesikeln durch eine Aperturöffnung von 7 μm als Modulation im Strom-Zeit-Diagramm bei einer Klemmspannung $V_C = -80$ mV konstant.

Figur 11 zeigt im Strom-Zeit-Diagramm dass die Zugabe von Ca^{2+} mit einer Endkonzentration von 4 mM nach dem Andocken von Vesikeln an die unmodifizierte Aperturöffnung (7 μm) zu einem elektrisch hochdichten Abschluss zwischen Chipoberfläche und Vesikelmembran führt.

Figur 12 zeigt das zeit- und spannungsabhängige Schalten von Alamethicinporen in einer auf dem Chip erzeugten Membran ($C_{\text{Alamethicin}} = 0.1$ $\mu\text{g/ml}$ in 85 mM KCl) bei negativen Potentialen.

Figur 13 gibt Änderungen des Membranwiderstandes einer auf einem Si/ SiO_2 Trägerchip erzeugten Membran nach der Fusion mit nAChR (nicotinischer Acetylcholin Receptor) enthaltenden Vesikeln wieder.

(A) Zufällige Rezeptoröffnungen in Abwesenheit von Liganden bei 400 mM KCl und positiven Potentialen.

(B) 150 Sekunden nach Zugabe des nAChR Agonisten Carbamylcholin (20 μM Endkonzentration) sind keine Rezeptoröffnungen mehr zu beobachten (Desensitisierung).

Wege zur Ausführung der Erfindung

Das Verfahren resp. die Vorrichtung (Messanordnung) der vorliegenden Erfindung sind speziell geeignet für den Einsatz beim Wirkstoffscreening, als Ersatz konventioneller Patch-clamp-Techniken und als por-

table Biosensoren, beispielsweise für die Umweltanalytik. Beispielhafte Messanordnungen sowie Anwendungsgebiete derselben werden in der Folge etwas näher beschrieben.

5 Die erfindungsgemässe Messanordnung weist mindestens zwei Elektroden 6, 9 und separierte, für die Aufnahme von Flüssigkeit geeignete Kompartimente auf und ist dadurch gekennzeichnet, dass sich zwischen zwei gegenüber befindlichen, in je mindestens ein Kompartiment
10 hineinreichenden oder ein solches berührenden, und beliebig geformten Redoxelektroden 6, 9 ein Träger 1, befindet, der mindestens eine Apertur 3 enthält und jeweils mindestens 2 Kompartimente voneinander trennt.

Vorzugsweise weist sie auf einer Seite oder
15 auf beiden Seiten des Trägers 1 Mittel auf, die eine Flüssigkeitszugabe, eine Flüssigkeitsspeicherung, und gegebenenfalls einen Flüssigkeitsaustausch, sowie die Zugabe von Zellen, Vesikeln, anderen biologischen Organellen oder Teilen derselben zwischen Träger und Elektrode ermöglichen. Die Apertur 3 weist vorzugsweise einen solchen Durchmesser auf, dass sich bei Existenz einer Spannungsdifferenz über dem Chip, vermittelt durch die Elektroden 6, 9, ein inhomogenes elektrisches Feld um die Apertur aufbaut, das mit Annäherung an die Apertur betragsmässig
25 grösser wird und nahe der Apertur Vesikel, Zellen, Zellfragmente oder biologische Organellen elektrophoretisch auf diese zubewegen kann. Des weiteren bevorzugt ist, dass der Träger 1 eine elektrisch geladene Oberfläche 5 aufweist, die attraktiv für biologische Membranen ist, oder eine Oberfläche 5 aufweist, die eine molekülspezifische oder durch multivalente Ionen vermittelte Bindung von Zellen, Vesikeln, Membranfragmenten oder biologischen Organellen daran gestattet. Ein solcher Träger ist beispielsweise ein Silicium-Trägerchip mit aufgebracht
30 Oxyd- oder Oxynitridschicht. Eine elektrisch geladene Oberfläche 5 kann auch durch Modifikation, insbesondere mittels Polykationen und/oder Silanen, z.B. Aminosilanen,

erzeugt werden, oder der Träger kann eine Beschichtung 2 mit elektrisch geladener Oberfläche 5 aufweisen. Der Träger 1 kann zusätzlich vor der Modifikation seiner Oberfläche oder vor seiner unmittelbaren Benutzung in einem Sauerstoffplasma gereinigt und teilweise oder vollständig hydrophylisiert werden.

Aufgrund der speziellen Anordnung ist es nicht notwendig, dass die erfindungsgemäße Messanordnung Kompartimente mit physischer Begrenzung aufweist.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Messanordnung sind jeweils eine Elektrode und mindestens eine Apertur 3 im Träger 1 über einen Kanal oder eine Kammer 8 in einem Abstandhalter 7, 10 unter Ausbildung eines offenen oder geschlossenen Kompartiments miteinander verbunden.

Auch können mehr als zwei Elektroden 6, 9 und mehr als eine Apertur 3 vorhanden sein, derart, dass mindestens eine Elektrode, z.B. eine Referenzelektrode, der Messung über mehr als eine Apertur 3 dient, oder die Messanordnung kann einen Träger 1 mit mehr als einer Apertur 3 und doppelt so vielen Elektroden 6, 9 wie Aperturen 3 aufweisen, derart, dass sich jeweils eine Apertur 3 zwischen jeweils zwei Elektroden 6, 9 befindet.

Ferner können die Kompartimente über Schläuche mit einem Pumpensystem oder einem Gerät, das auf hydrostatischer Druckbasis oder mittels eines Piezotropfenverfahrens resp. Tintenstrahlverfahrens oder mittels eines Kontakttransferverfahrens oder elektroosmotischen Verfahrens oder temperaturkontrollierten Verfahrens arbeitet, gekoppelt sein, derart, dass Flüssigkeiten resp. Proben in beliebige Kompartimente zugegeben oder darin ausgetauscht werden können.

Auch kann die erfindungsgemäße Messanordnung mit einer Apparatur zur Erzielung einer Probenauftrennung, insbesondere Kapillarelektrophorese (CE) und HPLC, gekoppelt sein und der Analyse der aufgetrennten Substanzen dienen, oder sie kann mit Mitteln versehen

sein, die der kontinuierlichen oder regelmässigen Prüfung des Flüssigkeitsstands in den Kompartimenten dienen, sowie mit Mitteln für die Nachregelung entsprechend voreingestellter Füllparameter.

5 In einer weiteren Ausführungsform kann die Oberfläche 5 des Trägers 1 derart strukturiert sein, dass sich hydrophile und hydrophobe Bereiche ergeben, wobei sich die hydrophilen Bereiche vorzugsweise um die Apertur befinden.

10 Solche Messanordnungen lassen sich z.B. für die nachfolgend näher beschriebenen Messungen verwenden:

Wirkstoffscreening:

Die vorliegende Erfindung eignet sich ausgezeichnet für die Sondierung einer grossen Anzahl von potentiellen Liganden, die mittels der kombinatorischen Chemie in jeweils kleinen Mengen herstellbar sind. Andererseits sind auch viele Rezeptorproteine, vor allem ligandengesteuerte und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, nur in sehr begrenzten Mengen verfügbar. Dank dem erfindungsgemässen Verfahren resp. der erfindungsgemässen Messanordnung/Messvorrichtung ist es möglich, mit sehr wenigen Zellen zu arbeiten, entweder direkt oder nach vorheriger Isolation und Rekonstitution der Rezeptorproteine in Vesikel bzw. Lipidmembranen. Durch das unkomplizierte Anordnen der Sensorelemente in Arrays können verschiedene Substanzen oder Rezeptoren zeitlich simultan selektiert werden. Es besteht zudem die Möglichkeit, die Rezeptoraufreinigung und Rekonstitution in Lipidvesikel mikrochromatographisch in die erfindungsgemässe Vorrichtung wahlweise integrierbaren on-chip Containern vorzunehmen.

Ersatz konventioneller Patch-clamp-Techniken:

Wie bereits eingangs erwähnt bilden konventionelle Patch-clamp-Techniken die Grundlage für die Untersuchung der Funktionalität von Membranrezeptoren sowie allgemein der Veränderung membranären Eigenschaften als

Antwort auf signal- und metabolische Prozesse in Zellen. Dienen als Untersuchungsobjekt isolierte Zellen einer homogenen Zellpopulation, wie dies beispielsweise bei transformierten Zellen oft der Fall ist, kann das erfindungsgemäße Verfahren als mindestens gleichwertiger Ersatz zur Patch-clamp-Technik dienen. Als Untersuchungsobjekte für dieses Verfahren eignen sich z.B. dissoziierte Neuronen und kultivierte Säugerzelllinien sowie Pflanzenprotoplasten.

10

Portable Biosensoren/Umweltanalytik:

Die ausgezeichnete mechanische Stabilität des erfindungsgemäßen Messsystems bzw. dessen praktisch automatischer Membranaufbau erlauben dessen Verwendung in Biosensoren. Durch Verwendung geeigneter transformierter Zellen oder in Vesikeln rekonstituierter Rezeptoren oder kanalbildender Proteine können Sensoren aufgebaut werden, die für sehr verschiedene Substrate bzw. Metaboliten sensitiv sind. Dabei ist bei sehr guter Membranabdichtung (seal formation), wie sie dank der erfindungsgemäßen Vorrichtung erzielt wird, die Empfindlichkeit prinzipiell nur von der Bindungskonstanten des Rezeptors abhängig und kann z.B. bei G-proteingekoppelten Rezeptoren unter einem Nanomol und bei ionotropen Rezeptoren (z.B. 5 HT₃, nAChR, GABA_AR, GlycineR, GluR) im nanomolaren Bereich liegen (North, R. A. (1994). Ligand- and voltage-gated ion channels, CRC Press; Peroutka, S. J. (1991). Serotonin receptor subtypes - Basic and clinical aspects. New York, John Wiley & Sons; Peroutka, S. J. (1994). G Protein coupled receptors, CRC Press; Conley, E. C. (1996). The ion channel facts book, Academic Press).

Dem erfindungsgemäßen Messverfahren liegt das folgende bekannte Messprinzip zugrunde:

Die elektrischen Eigenschaften transmembranären Ionenkanäle oder ionotroper Rezeptoren werden im allgemeinen mit sogenanntem voltage-clamp-Techniken (z.B.

klassisches Voltage-Clamp, Patch-Clamp und Oocyten-Voltage-Clamp) charakterisiert (siehe Hamill, Marty et al. 1981 a.a.o; J.G. Nicholls, A.R. Martin et al. (1992). From neuron to brain: a cellular and molecular approach to the function of the nervous system. Sunderland, Ma., Sinauer Associates, Inc.). Dazu wird über der Membran, die den oder die betreffenden Ionenkanäle enthält, eine elektrische Potentialdifferenz angelegt und gleichzeitig der zur Aufrechterhaltung dieser Differenz notwendige Strom analysiert. Entsprechend dem Ohmschen Gesetz, wonach $V = I \times R$ bzw. $I = V / R$ ist, liefert diese Analyse eine Aussage über die Leitfähigkeit und damit - allerdings nicht eindeutig - verbunden eine Aussage über den Konformationszustand des kanalbildenden Proteins. Daraus lassen sich Ligandenbindungsereignisse, Spannungsabhängigkeiten usw. ermitteln.

Da der Ionenfluss durch ionotrope Membranproteine mit 0.1 - 50 pA bei $V_M = -60$ mV Membranspannung im allgemeinen sehr klein ist, muss für ein akzeptables Signal-Rauschverhältnis die Varianz der auftretenden Leckströme etwa um den Faktor 5-10 unter den zu messenden Signalen liegen. Diese Leckströme treten im wesentlichen zwischen der Membran und deren Befestigung auf und stellen das prinzipielle Hauptproblem bei allen Voltage Clamp Techniken dar.

Das Problem kann verschiedenartig gelöst werden, z.B. durch Vergrößerung des zu vermessenden Membranareals und damit, durch Aufsummation, eine Vergrößerung der Ionenströme. Allerdings geht dabei, gerade in biologischen Systemen, die Spezifität verloren. Es wird dann im allgemeinen keine eindeutige oder vollkommen artefaktfreie Aussage, z.B. bei Ligandenzugabe, mehr möglich sein.

Das Problem des ausreichenden Signal-Rauschabstandes kann aber auch gelöst werden, indem ein sehr hoher Abdichtwiderstand (seal) zwischen Membran und Elektrode aufgebaut wird. Dieses Prinzip wird bei der vorlie-

genden Erfindung angewendet. Dazu wird ein planarer Trägerchip mit einer für Zellen und Vesikel stark adhäsiven Oberfläche verwendet. Dieser Chip trennt die bei der Messung auf unterschiedliche Potentiale geklemmten zwei Kompartimente, wobei sich in dessen Mitte eine (sub)mikrometergrosse Öffnung befindet. Diese Öffnung oder Pore (Apertur) ist mit Referenzpufferlösung gefüllt und wird während der Messung durch die starke Bindung von Zellen bzw. Vesikeln an die Oberfläche elektrisch dicht verschlossen. Diese elektrisch sehr dichte Bindung erlaubt die Messung auch sehr kleiner (0.1 pA) Ionenströme.

Ähnliche Ansätze mit Lipidmembranen, die jedoch ohne Träger mit den erfindungsgemässen Anforderungen resp. der erfindungsgemässen Modifizierung der Oberfläche auskamen, waren bisher, bedingt durch das Auftreten zu geringer Abdichtwiderstände der Membran, für sensitive Messungen nicht einsetzbar. Dazu gehören LB Transfers (R. Coronado und R. Latorre (1983). "Phospholipid bilayers made from monolayers on patch-clamp pipettes." Biophys. J. 43(2): 231-6; D.P. Nikolelis und C.G. Siontorou (1995). "Bilayer lipid membranes for flow injection monitoring of acetylcholine, urea, and penicillin." Anal. Chem. 67(5): 936-44; T.D. Osborn und P. Yager (1995). "Formation of planar solvent-free phospholipid bilayers by langmuir-blodgett transfer of monolayers to micromachined apertures in silicon." Langmuir 11(1): 8-12; T.D. Osborn und P. Yager (1995). "Modeling success and failure of Langmuir-Blodgett transfer of phospholipid bilayers to silicon dioxide." Biophys. J. 68(4): 1364-73 und Vesikel Spreitung (P. Nollert, H. Kiefer et al. (1995). "Lipid vesicle adsorption versus formation of planar bilayers on solid surfaces." Biophys. J. 69(4): 1447-55; J. Radler, H. Strey et al. (1995). "Phenomenology and Kinetics Of Lipid Bilayer Spreading On Hydrophilic Surfaces." Langmuir 11(11): 4539-4548). Ein miniaturisierter Black Lipid Membrane (BLM) Aufbau wurde von Eray, Dogan et al. 1995 berichtet (siehe M. Eray, N.S. Dogan et al. (1995). "A

highly stable and selective biosensor using modified nicotinic acetylcholine receptor (nAChR)." Biosystems 35(2-3): 183-8).

Kritischer Punkt beim erfindungsgemässen Verfahren ist die genaue Positionierung der Zellen und Vesikel über der Pore (Apertur). Diese Positionierung wird durch die erfindungsgemässe Elektrodenanordnung und Feldfokussierung erzielt. Der Abstand zwischen Mess- und Referenzelektrode beträgt üblicherweise < 6 mm, kann aber auch grösser sein. Dabei befinden sich die Mess- und Referenzelektrode jeweils im Abstand von ca. 0,2 bis 3 mm, vorzugsweise 0,5-2 mm, insbesondere 0,5 bis 1 mm unter- und oberhalb des Trägerchips. Verwendet wird eine Klemmspannung, die für eine elektrophoretische Positionierung der Vesikel auf die Apertur ein wirksames elektrisches Feld erzeugt. Diese Spannung ist nicht kritisch, sie liegt aber üblicherweise im Bereich $V_c = -30$ bis -300 mV, insbesondere -60 bis -100 mV und speziell bevorzugt -60 bis -80 mV. Durch die damit bedingte elektrophoretisch treibende Kraft werden Vesikel und Zellen, dem elektrischen Feld folgend, genau auf die Chipöffnung zubewegt. Da das Feld E stark inhomogen ist und sich mit Annäherung an die Apertur betragsmässig stark vergrössert, werden Vesikel automatisch auf die Apertur zubewegt. Da die elektrophoretisch wirksamen Feldstärken vor allem nahe der Apertur wirksam werden (Distanz zur Apertur < 200 μm), müssen die Zellen/Vesikel in diesen Bereich hineingebracht werden oder konvektiv dorthin gelangen. Dazu kann sich in der Messelektrode ein Loch (z.B. $d < 1$ mm) gegenüber der Trägerchipöffnung (Apertur) befinden.

Für alle Messungen ist es wichtig, dass der Öffnungs- resp. Aperturdurchmesser wesentlich kleiner als der Durchmesser der Vesikel oder biologischen Zellen ($d_{\text{Zelle}}, d_{\text{Vesikel}} \gg d_{\text{Apertur}}$) ist. Für die Aperturen von $d > 2$ μm werden deshalb vorzugsweise Vesikel mit Durchmessern $d > 20$ μm verwendet.

Die charakteristischen elektrischen Eigenschaften lassen sich wie folgt mathematisch beschreiben:

Das thermische Rauschen σ einer zirkulären Lipidmembran ist prop. zu $R_M^{-1/2}$ (B. Sakmann und E. Neher (1983). Single-channel recording. New York, London, Plenum Press.):

$$\sigma = \sqrt{\frac{4kTf_c}{R_M}}$$

10 mit $R_M = R_{spec} / (\pi r_M^2)$ folgt daraus:

$$\sigma = r_M \sqrt{\frac{4\pi kTf_c}{R_{spec}}}$$

15 In diesen Formeln bedeutet σ den effektiven Rauschstrom, r den Radius, f die Frequenz, k die Boltzmann Konstante, R den Widerstand und T die Temperatur.

Damit ergibt sich als Konsequenz für eine zu Messzwecken erfolgreich einsetzbare Membran, dass

20 $r_M / \sqrt{R_{spec}}$ sehr klein sein muss. Die Minimierung dieses Produktes kann erfindungsgemäss auf 2 Wegen beschritten werden, einerseits durch Minimierung des Membranradius r_M und andererseits resp. zusätzlich durch den elektrisch dichten Abschluss der verwendeten Membranen.

25 Die mechanische Stabilität der Membran ist abhängig von deren Grösse. Die Grösse der Aperturöffnung in den Trägern bedingt den Durchmesser der zu bildenden Membran. Vorzugsweise besitzen die Apertur und das Fenster einen vergleichbaren Durchmesser. Da die zur Auslenkung einer Membran notwendige Kraft proportional zu r_M^{-2} ist, folgt bei Strukturen von $d_{Apertur} < 5 \mu m$ und folglich $d_M < 5 \mu m$ eine extreme Zunahme der Membranstabilität verglichen mit typischen Öffnungsweiten von $d_{Apertur} > 100 \mu m$ bei konventionellen BLM Systemen.

Wie bereits früher ausgeführt können Träger für Lipidmembranen aus verschiedenen Materialien hergestellt werden, aufgrund ihrer guten und exakten Bearbeitbarkeit werden aber Si/SiO₂ und Silizium/Siliziumoxy-
5 nitrid Träger bevorzugt.

Die als Träger (Fig. 1) für die Lipidmembranen bevorzugt verwendeten Si/SiO₂ Chips können aus handelsüblichen Si-Wafern 1 mit einer Oxyd- oder Oxynitridschichtdicke 2 von gewöhnlich > 200 nm hergestellt werden. Nach Fotolithographie bzw. bei Aperturen 3 von $d < 1.5 \mu\text{m}$ Elektronenstrahlolithographie werden die Strukturen durch anisotropes Ätzen des Siliziums in KOH-haltigem Medium sowie reaktives Ionenätzen der Quarzschicht gewonnen. Ein entsprechender Träger ist in Figur 1 schematisch
10 dargestellt, eine fotografische Aufnahme der Aperturöffnung zeigt Figur 2.

Wesentlich an diesen Strukturen ist die Grösse der Apertur, die wesentlich kleiner als die verwendeten Vesikel, Zellen bzw. Organellen sein sollte. Eine
20 Verringerung der Aperturgrösse ist für die Ausbildung eines hochwertigen Seals von Vorteil, führt aber andererseits zu einer Verringerung des elektrischen Attraktionsbereiches um die Apertur. Aperturen von 0.3 bis $7 \mu\text{m}$ ergeben eine ausgezeichnete Sealwahrscheinlichkeit und -qualität.
25 Die Grösse des Fensters 4 (Fig. 1) ist im Idealfall auf die Grösse der Apertur 3 reduziert.

Bei der Auswahl geeigneter Trägerchipmaterialien ist neben der Bearbeitbarkeit ausserdem auf eine ausreichende Modifizierbarkeit der Oberfläche zu achten,
30 damit eine elektrostatische oder gegebenenfalls kovalente Bindung von Vesikeln oder biologischen Zellen daran möglich ist. Es hat sich hier gezeigt, dass eine mehrminütige Behandlung der Trägerchips in O₂ - Plasma vor der eigentlichen Oberflächenmodifizierung sehr zu konsistenten Ober-
35 flächeneigenschaften beiträgt.

Um eine starke Adhäsion der Vesikel zu gewährleisten, wird die Oberfläche des Trägers gegebenen-

falls mit einem Haftverbesserer, beispielsweise Polykationen, beschichtet (siehe Mazia, Schatten et al., a.a.O. 1975). Für die Physisorption kann beispielsweise eine wässrige Lösung von Polykationen, z.B. 0.1 % Poly-L-Lysinbromid (Sigma), MW 100 000, direkt vor der Messung für 2-5 Min. auf den Träger gegeben und anschliessend mit Messpufferlösung abgespült werden. Die kovalente Bindung peptidischer Polykationen erfolgt vorzugsweise über vorher aktivierte Hydroxylgruppen der Quarzoberfläche, z.B. mittels Tosylchlorid (Triphenylchlormethan) (M.L. Williamson, D.H. Atha et al. (1989). "Anti-T2 monoclonal antibody immobilization on quartz fibers: stability and recognition of T2 mycotoxin." Analytical Letters 22(4): 803-816).

Durch die Modifizierung der Trägeroberfläche erreicht man eine Anziehung von Vesikeln mit negativer Oberflächenladung, die vollkommen ausreichend für elektrisch hochdichte Abschlüsse zwischen Membran und Trägeroberfläche ist.

Die Vesikel- resp. Zellbindung kann auch durch molekülspezifische Wechselwirkungen, z.B. Biotin-Streptavidin oder Histidin-NTA (Histidin-Nitrilotriacetic acid) vermittelt werden.

Alternativ zu der beschriebenen Verwendung von Polykationen kann die Oberfläche auch durch andere Verbindungen mit Kationeneigenschaften im gewünschten pH-Bereich, wie z.B. 4-Aminobutyl-dimethyl-methoxysilan, modifiziert werden.

Eine weitere Möglichkeit für die elektrisch dichte Bindung von Vesikeln an die SiO_2 -Oberfläche stellt die Zugabe von Ca^{2+} -Ionen zur Messlösung dar. Dabei wird, nach Aufsetzen eines Vesikels auf die Apertur die Ca^{2+} -Konzentration auf $> 2 \text{ mM}$ gesteigert. Das sofortige elektrische Abdichten der Membran wird in Figur 11 gezeigt.

Es hat sich gezeigt, dass ein Aufbau mit einer kurzen Distanz ($D < 5 \text{ mm}$) zwischen den Elektroden vorteilhaft ist, um bei kleinen Spannungen ($V_C < 200 \text{ mV}$,

insbesondere -200 bis 200 mV) eine hohe Feldstärke für die elektrophoretische Positionierung der Vesikel oder Zellen zu erreichen.

Die Elektroden werden vorzugsweise in einem solchen Abstand zueinander angebracht und die Kompartimente sowie die Apertur derart mit Puffern resp. Lösungen gefüllt werden, dass sich in einem sphärisch, aber beliebig geformten in die Kompartimentflüssigkeit hineinreichenden Raumgebiet um die Apertur Feldstärken $> 100 \text{ V/m}$ ergeben.

Im folgenden wird der konkrete Aufbau eines erfindungsgemäßen Messsystems mit planaren Elektroden beschrieben (Fig. 3): Eine Elektrode 6, beispielsweise eine Silberplatte (z.B. Reinheit $> 99.98\%$ Ag, geringere Reinheit ist aber auch möglich) mit den Abmessungen $20 \times 20 \times 2 \text{ mm}^3$, wird als Sensorträger und gleichzeitig als Referenzelektrode verwendet. Auf dieser Elektrode ist, mittels eines Abstandhalters 7, z.B. einer $0.5\text{--}2 \text{ mm}$ dicken Silikonkautschuk Dichtung (Sylgard 184, Dow Corning, USA) im richtigen Abstand und parallel, der eigentliche Membranträgerchip 1 positioniert. Der Abstandhalter weist einen ca. 1 mm breiten und $< 6 \text{ mm}$ langen Kanal (bzw. eine Kammer) 8 auf, der beispielsweise eingeprägt werden kann und der, mit Pufferlösung gefüllt, Kontakt zwischen der Apertur 3 resp. der Membran und der Referenzelektrode 6 herstellt. Zur Herstellung einer Referenzelektrode, z.B. der bevorzugten Ag/AgCl Elektrode, wird der Kanal beispielsweise mit 1 M HCl gefüllt und unter Spannung, z.B. bei $V = 0.8 \text{ V}$ das im Kanal exponierte Silber für 90 Sek. chloriert. Die Trägerchips 1 werden nach Benetzung ihrer Unterseite mit Pufferlösung auf den mit Referenzpufferlösung gefüllten Kanal 8 aufgesetzt.

Bei der Messung bzw. der Membranherstellung wird die Mess- bzw. Vesikellösung dann direkt auf die Apertur 3 resp. das Fenster 4 auf der Oberseite des Trägerchips 1 bzw. auf die Oberseite der Messelektrode 9 gegeben, z.B. ein Volumen V von ca. $5\text{--}10 \mu\text{l.}$ Zur Minimie-

5 rlung von Störanfälligkeiten kann die Region um die Aper-
tur 3 in einem Abstand von z.B. $r = 1$ mm durch einen Si-
likonring 10 (Sylgaard) begrenzt werden. Dieser Ring 10
bildet zusammen mit dem Meniskus, der sich zwischen Chip
10 und Messelektrode ausbildet, die Probenkammer (Proben-
kompartiment). Die Messelektrode 9, beispielsweise aus
0.8 mm starkem chloriertem quadratischem Silberblech
(z.B. 4×4 mm²), insbesondere aber ringförmigem Silberblech
(z.B. $d = 2$ mm) wird insbesondere parallel zur Chipober-
fläche positioniert, vorzugsweise in einem Abstand bis zu
ca. 1 mm, wobei sich die zur Zell- resp. Vesikel- und
Messlösungszugabe darin befindliche und vorzugsweise
trichterförmige Öffnung 11 ($d_{\min} = 0.4-1$ mm) vorzugsweise
genau konzentrisch gegenüber der Mikroapertur 3 im Trä-
15 gerchip 1 befindet. Die Messelektrode kann oberhalb und
unterhalb mit je einem Abstandhalter 12 versehen sein,
die zur Gestaltung der Zugabeöffnung 11 beitragen.

Durch Ausnutzung von Kapillarkräften bei der
Füllung und Speicherung des Referenz- und Messpuffers ist
20 das System trotz seiner Offenheit bezüglich der Flüssig-
keitsspeicherung mechanisch sehr stabil. Durch die Offen-
heit werden Störungen der Membran durch hydrostatische
Druckdifferenzen, wie sie bei geschlossenen Systemen z.B.
durch Temperaturdifferenzen auftreten können, ausge-
25 schlossen.

Eine weitere Realisierungsvariante verwendet
Punkt- bzw. Drahtelektroden (Fig. 4): Dabei wird der
oberflächenmodifizierte und gegebenenfalls auf einem ins-
besondere planaren Halter, z.B. einem Glas- oder Teflon-
30 halter befestigte Chip 1 zwischen die chlorierten Endflä-
chen 10 zweier oberhalb und unterhalb des Chips 1 ange-
ordneter, gegebenenfalls aussen (mit Ausnahme der Endflä-
chen) mit einer Schutzschicht 11, insbesondere einer Te-
flonschicht, versehenen Silberdrähte, resp. Silberelek-
35 troden 6, 9 mit beispielsweise einem Durchmesser $d = 0.1$
- 2 mm (ohne Schutzschicht) gebracht (Distanz Elektrode 6
- Elektrode 9 z.B. 4 mm). Mittels Pipette oder nahe am

Chip angebrachten Schläuchen oder einem der im folgenden aufgezählten Probenhandhabungssysteme wird Pufferlösung zu beiden Seiten des Chips gegeben und durch Kapillarkräfte zwischen Chip und Elektrode gehalten. Nach Offsetkalibrierung und Anlegen einer geeigneten Spannung von üblicherweise $V = -60$ bis -100 mV werden die Vesikel/Zellen mittels Pipette oder eines weiteren Schlauchs oder einem der im folgenden aufgezählten Probenhandhabungssysteme zur modifizierten Chipseite hinzugegeben.

10 Vesikelbindung und Membranausbildung werden anhand der Veränderung der elektrischen Parameter verfolgt.

Die allgemein beschriebene Messanordnung sowie die im Detail beschriebenen Realisierungsbeispiele eignen sich prinzipiell für integrierte und um ein Probenhandhabungssystem erweiterte Systeme. Dazu zählen flüssigkeitstransportierende Systeme die z.B. auf der Basis von Pumpen, hydrostatischen Druckdifferenzen, elektroosmotischen, piezoelektrischen und Temperatur Effekten oder mechanischer Verschiebung definierte Flüssigkeitsvolumina in die und/oder aus den Flüssigkeitskompartimenten des beschriebenen Aufbaus befördern können. Gleichzeitig ist eine einfache Parallelisierung des beschriebenen Aufbaus, entweder auf einem Multiaperturchip oder mit mehreren Trägerchips mit einer Apertur, möglich.

25 Grosse unilamellare Vesikel (Giant Unilamellar Vesicles, GUV), die als Membranen geeignet sind, können mittels der Hydratationsmethode hergestellt werden (H.H. Hub, U. Zimmermann et al. (1982). "Preparation of large unilamellar vesicles." FEBS Lett. 140(2): 254-256;

30 P. Mueller, T.F. Chien et al. (1983). "Formation and properties of cell-size lipid bilayer vesicles." Biophys. J. 44(3): 375-81; K. Akashi, H. Miyata et al. (1996). "Preparation of giant liposomes in physiological conditions and their characterization under an optical microscope." Biophys. J. 71(6): 3242-50). Diese Methode gestattet bei entsprechender Modifizierung auch die Herstellung von Proteoliposomen (M. Criado und B.U. Keller

- (1987). "A membrane fusion strategy for single-channel recordings of membranes usually non-accessible to patch-clamp pipette electrodes." FEBS Lett. 224(1): 172-6; B.U. Keller, R. Hedrich et al. (1988). "Single channel recordings of reconstituted ion channel proteins: an improved technique." Pflugers Arch 411(1): 94-100).

Um eine elektrisch dichte Bindung der Vesikel an den Chip zu gewährleisten, ist eine der Trägeroberfläche entgegengesetzte Nettoladung der Vesikeloberfläche erforderlich. Die Vesikeloberfläche kann z.B. durch Palmitoyloleoylphosphatidylglycerol (POPG), negativ geladen werden, um möglichst physiologische Verhältnisse für membraninkorporierte Proteine zu gewährleisten.

- Nach der Positionierung können Zellen resp. Vesikel, falls diese nicht von selbst platzen, z.B. durch Behandlung mit hypotonischem Medium, z.B. reinem Wasser, aufgebrochen werden.

Messaufbauten des erfindungsgemässen planaren Typs eignen sich durch die damit verknüpften kurzen Diffusionszeiten auch besonders für die Verwendung von 'Perforated Patch' Techniken (R. Horn und A. Marty (1988). "Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method." J. Gen. Physiol. 92(2): 145-59; J. Rae, K. Cooper et al. (1991). "Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B." J. Neurosci. Methods. 37(1): 15-26). Bei diesen Techniken erreicht man eine elektrische Verbindung zum Zellinnern (Cytosol) durch Permeabilisierung des normalerweise an der Glaspipette haftenden Membranfleckens mit porenausbildenden Antibiotika. Ein Vorzug dieser Technik ist das Nichtauswaschen des Cytosols mit Messpufferlösung bei gleichzeitigem elektrischen Zugang.

- Erfindungsgemäss kann ein Porenbildner wie z.B. Amphotericin B oder Nystatin in das Referenzkompartiment gegeben werden, nachdem eine biologische Zelle oder unter speziellen Umständen auch Vesikel (wobei deren mechanische Stabilität ausreichend hoch sein muss) an die

Aperturoberseite gebunden wurden. Dabei ist die Geschwindigkeit der Perforierung des Membranpatches über der Apertur wesentlich grösser als bei vergleichbaren Patch-clamp-Techniken.

5 Zudem ist auch bei Zerstörung des Membranpatches, analog der Whole-Cell-Patch-Clamp-Technik (WCRT), eine einfache Zugabe grösserer Proteine über die Referenzlösung in das Cytoplasma möglich. Grund dafür ist der planare Aufbau des Messsystems, welcher im Vergleich zur
10 WCRT eine wesentlich schnellere Diffusion grosser Makromoleküle in das Cytosol bzw. Vesikelinnere erlaubt (Z.M. Pei, J.M. Ward et al. (1996). "A novel chloride channel in *Vicia faba* guard cell vacuoles activated by the serine/threonine kinase, CDPK." EMBO J. 15(23): 6564-74).

15 Die erfindungsgemässe Messanordnung resp. das erfindungsgemässe Positionierverfahren haben sehr breite Anwendungsmöglichkeiten. Neben den bereits vorne diskutierten Verwendungsmöglichkeiten können sie noch zur Trennung resp. zur Grössenanalyse von Vesikeln resp. Zellen dienen, der Positionierung von Zellen für z.B. rein
20 optische Untersuchungen oder Mikroinjektionen. Das System gestattet insbesondere die direkte funktionelle Analyse ionotroper Membranproteine, z.B. in Ligandenbindungsstudien. In Verbindung mit seinem einfachen Aufbau der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und der mechanischen Stabilität der Membranabschlüsse eignet es sich auch besonders für Biosensoren im Screening-Bereich und stellt hier
25 eine kosten- und zeitsparende Alternative zu Patch-clamp-Techniken dar. Die einfache Parallelisierbarkeit des Systems macht es prinzipiell auch für HTS geeignet.
30

Die Untersuchungen können unter Verwendung von Zellen und Vesikeln aber auch Zellfragmenten, zellulärer Organellen und Lipidmembranen erfolgen.

Das Verfahren gestattet eine Aufzeichnung des
35 Membranwiderstandes mit gutem Signal-Rauschabstand.

Im erfindungsgemässen Verfahren können die Messlösung oder die Referenzlösung oder beide Lösungen

durch eine andere Lösung ausgetauscht werden oder eine zu analysierende Substanz zur Lösung mess- und/oder referenzseitig hinzugegeben werden, z.B. ein Porenbildner, der einem oder beiden Kompartimenten zugesetzt werden kann
5 mit dem Ziel, die elektrische Leitfähigkeit resp. die Permeabilität der Membran gegenüber bestimmten Ionen zu erhöhen, oder Proteoliposomen beliebiger Grösse, mit dem Ziel, diese mit der Membran über der Apertur 3 zu fusionieren und damit beliebige darin enthaltene Membranpro-
10 teine elektrischen oder optischen Messungen zugänglich zu machen. Auch können nach dem Aufbau einer Membran über der Apertur (3) Membranproteine in diese eingebaut werden.

Das Verfahren kann auch derart durchgeführt
15 werden, dass eine Apparatur verwendet wird, die derart gestaltet ist, dass die über der Apertur 3 befindliche Membran optischen, insbesondere Fluoreszenzmessungen, zugänglich ist und diese daran ausgeführt werden.

Auch können mehreren Aperturen 3 auf einem
20 Träger verwendet werden, und die Messungen über mindestens zwei Aperturen 3 sequentiell und/oder parallel erfolgen und/oder derart, dass alle oder mehrere Elektroden auf einer Seite des Trägers 1 ein gemeinsames elektrisches Potential besitzen resp. zu einer Elektrode vereinigt werden.
25

Das Verfahren wird nun anhand von Beispielen näher erläutert. Diese sollen in keiner Weise als den Umfang der Erfindung einschränkend ausgelegt werden.

30 Beispiele

Vesikel-Bildung und Grössentrennung

100 µl Asolectin (Fluka) oder Eilecithin
(EPC), 50 µl Palmitoyloleyphosphatidylglycerol (POPG), 3
35 µl Dipalmitoylphosphotidylethanolamin-Rhodamin (DPPE-Rhodamin) (Molecular Probes, USA) (alles 10 mg/ml in Chloroform, Avanti Polar Lipids) und 70 µl Methanol wur-

den in einem Rotationsverdampfer (Büchi Rotavapor R-114) bei 400 mmHg Unterdruck in einem 10 ml Rundkolben zu einem Film eingetrocknet. Nach anschliessender einstündiger Inkubation im Vakuum wurden 10 ml H₂O oder 10 ml eine
5 Pufferlösung mit < 150 mM KCl und/oder < 600 mM Sucrose oder vorzugsweise Sorbitol hinzugegeben. Die bei diesem Vorgang gebildeten Vesikel zeigten sich als fast durchsichtige Wolke nach etwa 16 h bei 37°C. Die Vesikel wurden mit einer 1 ml Pipette abgesaugt und nach (optiona-
10 ler) Zugabe von Natriumazid (NaN₃, Endkonzentration 0,2 Gew.-%) bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die Herstellung von Lipidvesikeln nach diesen Verfahren ergab grösstenteils (> 90 %) unilamellare Vesikel bis zu einer Grösse von 250 µm (Fig. 5). Ein Teil
15 der Vesikel enthielt weitere, kleinere Vesikel, die aber für die Membranbildung nicht relevant waren. Die Verwendung von gereinigten Vesikeln zum Aufbau elektrisch dicht mit der Oberfläche abschliessender Membranen erforderte die Abtrennung aller Vesikel und Lipidverunreinigungen,
20 die kleiner als 10 µm waren. Bei unzureichender Trennung kam es durch die Bindung kleiner Vesikel in Aperturnähe zu Abstossungseffekten, die einen elektrisch dichten Aperturabschluss durch grosse Vesikel (> 10 µm) verhin-
derten. Die Vesikel wurden bezüglich ihrer Grösse durch >
25 20 h Dialyse über ein Nylonnetz mit 20 µm Porengrösse getrennt; wenn nötig kann bei entsprechender Lipidzusammensetzung die Fluidität der Vesikelmembran erniedrigt werden durch Absenkung der Temperatur auf ≤ 4°C, insbesondere 1°C. Die Unilamellarität der Vesikelmembranen kann bei
30 geeigneter Präparation durch Zugabe von Alamethicin (siehe dazu R.B. Gennis (1989). Biomembranes: molecular structure and function. New York, Berlin, Heidelberg, Springer Verlag) gezeigt (Fig. 12) und durch konfokalmikroskopische Analysen gestützt werden (Fig. 6).

35

Elektrophoretische Positionierung der Vesikel

Variante 1:

Vor jeder Messung wurde die Offsetspannung V_{offset} zwischen den Elektroden korrigiert. Dazu wurden 5 μl Pufferlösung direkt auf die Apertur gegeben und anschliessend die Messelektrode bis auf 1 mm an die Chipoberfläche genähert. Nach der Ausbildung eines Flüssigkeitsmeniskus zwischen Chipoberfläche und Elektrode wurden die Offsetspannung und Kapazität des Systems kompensiert.

10 $10 \mu\text{l}$ einer vesikelhaltigen Dispersion wurden anschliessend auf die Oberseite der Messelektrode gegeben, wobei die Vesikel durch die in der Messelektrode befindliche kreisförmige Öffnung sedimentieren konnten. Vesikel, die sich durch die Messelektrodenöffnung bewegt hatten, wurden unter dem Einfluss des der angelegten
15 Elektrodenspannung $V_M = -50$ bis -80 mV entsprechenden elektrischen Feldes direkt auf die Aperturöffnung beschleunigt. Dabei war die erreichte Fokussierung, gemessen an der Zahl von Vesikeldurchtritten durch die Aperturöffnung bei unmodifizierten Oberflächen, von der Fenstergrösse abhängig (als Fenster wird der durch das Ätzen freigelegte Teil der SiO_2 Schicht bezeichnet (Fig. 2). In Gegenwart kleiner SiO_2 Fenster ($< 45 \times 45 \mu\text{m}^2$) war der Vesikeldurchsatz deutlich gesteigert.

Variante 2:

25 Vor jeder Messung wurde die Offsetspannung V_{offset} zwischen den Elektroden korrigiert. Dazu wurde nach Zugabe von 5 μl Pufferlösung zwischen Chip und Messelektrode resp. Referenzelektrode die Spannung ermittelt, bei welcher der Stromfluss verschwindet, d.h.
30 $I(V_{\text{offset}}) = 0 \text{ pA}$.

3 μl einer vesikelhaltigen Dispersion wurden anschliessend zum Messkompartiment nahe der Apertur gegeben, wobei die Vesikel im Fall einer planparallelen Elektrodenanordnung durch die in der Messelektrode befindliche kreisförmige Öffnung sedimentieren konnten. Vesikel,
35 die in den Bereich sehr hoher Feldstärke (bis zu mehreren

kV) in der Nähe ($< 200 \mu\text{m}$) der Apertur kamen, wurden entsprechend des elektrischen Feldverlaufes direkt auf die Aperturöffnung beschleunigt und nach elektrisch dichter Bindung an die Chipoberfläche elektrisch analysiert.

5

Die in Variante 1 und 2 beschriebene elektrische Positionierung war der gleichfalls getesteten Schwerkraft-Sedimentation von Zellen und Vesikeln in folgenden Punkten überlegen: notwendige Vesikel- bzw. Zellanzahl, insgesamte Geschwindigkeit der Membranbildung und Wahrscheinlichkeit eines erfolgreichen Membranaufbaues bzw. Zellbindung.

15 Vesikel Bindung und Adsorption an modifizierte SiO_2 -Oberflächen

Die Bindung der oben beschriebenen Vesikel an Polylysin-modifizierte SiO_2 -Oberflächen wurde untersucht. Diese war sehr stark und ereignete sich nach entsprechender Annäherung in weniger als 0.5 sec. Die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen und elektrisch dichten Positionierung war stark von der Aperturgrösse, der SiO_2 Fenstergrösse sowie der Anzahl, Grösse und Grössenverteilung der Vesikel abhängig. Trägerchips mit Aperturen $d_{\text{Apertur}} < 2 \mu\text{m}$ und Fenstern $< 40 \mu\text{m}$ ergaben in Verbindung mit Suspensionen von Vesikeln $d_{\text{Vesikel}} > 40 \mu\text{m}$ eine Wahrscheinlichkeit $> 90 \%$ ($n > 15$, wobei n die Anzahl Versuche bezeichnet) elektrisch dichter Membranabschlüsse. Geringe Schwankungen in der Ausbildung dichter Aperturabschlüsse von Chip zu Chip und bei verschiedenen Vesikelsuspensionen lassen darauf schliessen, dass eine Steigerung nutzbarer Aperturabschlüsse bei weiterer Verkleinerung der Aperturweite sowie der Verwendung besser gereinigter Vesikelsuspensionen verzeichnet werden kann.

Bei der Bindung der Vesikel an der Oberfläche wurden diese zu völlig flachen Gebilden ausgezogen (Fig. 6 und 7). Die Membran der Vesikel wurde mit 0.5% Rhodamin markiert (rot) und das Vesikelinnere mit Carboxyfluore-

35

scein (grün). Das Verschwinden jeglicher Carboxyfluorescein-Emission (eine Farbaufnahme zeigt ausschliesslich die rote Farbe des Rhodamins, in Fig. 6 als grau der Membranflecken erkennbar) deutet auf die Freigabe von Carboxyfluorescein und damit auf das Bersten der Vesikel und mithin Unilamellarität dieser Membranen hin. Der dabei an den Trägerchips gemessene sehr hohe Membranabichtwiderstand von $R_M > 6.4 \text{ G}\Omega$ ($n = 26$) in symmetrisch 85 mM KCl lässt auf die Ausbildung elektrisch weitgehend defektfreier Lipidmembranen schliessen. Der Fusionsprozess und das Fusionsergebnis der Vesikel auf Polylysin beschichtetem Glas wurden mit einem Konfokalmikroskop (LSM 510, Zeiss Jena, Germany) untersucht.

Bei einer analogen Messerie in symmetrisch 10 mM KCl wurde Bindung der Vesikel nach entsprechender Annäherung in weniger als 0.2 sec. mit einer Wahrscheinlichkeit von $> 70 \%$ ($n > 15$) sowie ein Membranwiderstand von $R_M > 10 \text{ G}\Omega$ gemessen.

Elektrische Parameter der Lipidmembranen

Vor jeder Fusion eines Vesikels mit der modifizierten Oberfläche wurde der hauptsächlich durch die Apertur bestimmte Widerstand des Messaufbaus bestimmt. Dieser betrug je nach Aperturgrösse bis zu $1 \text{ M}\Omega$ (gewöhnlich $< 450 \text{ k}\Omega$) in 85 mM KCl. Grössere Widerstände wurden als Artefakte, wie den Einschluss von Luftblasen unter der Aperturöffnung, gewertet.

Die bei der Vesikelfusion oder Zellbindung über der Apertur gebildeten Membranen besaßen einen Widerstand $R_M > 6.4 \text{ G}\Omega$ bei gleicher Ionenkonzentration. Dabei änderte sich die Kapazität der Trägerchips von einigen pF nur unwesentlich.

In einem analog durchgeführten Versuch in 1 mM KCl wurde der Widerstand des Messaufbaus ebenfalls als je nach Aperturgrösse bis zu üblicherweise $1 \text{ M}\Omega$ bestimmt. Bei gleicher Ionenkonzentration betrug der Widerstand der über der Apertur gebildeten Membranen üblicherweise $R_M >$

40 G Ω und in 10 mM KCl üblicherweise $R_M > 10$ G Ω . Die Kapazität der Trägerchips änderte sich auch in diesen Versuchen nur unwesentlich, von 160 - 280 pF.

5 Vesikeldurchgang durch Mikrometerporen

In Gegenwart negativ geladener Oberflächen, wie unmodifizierter SiO₂ Schichten oder um die Apertur fusionierter Vesikel, konnte der Durchgang von Vesikeln durch die Apertur anhand der Widerstandsänderungen beobachtet werden (Fig. 10). Zur Kontrolle auf Artefakte wurde die Spannung umgepolt, wobei keine Widerstandsmodulationen beobachtet wurden.

Bis zu 18 Sek. lange Vesikelpassagen lassen auf das Passieren sehr grosser Vesikel mit ausreichend fluiden Membranen schliessen. Besonders bei der Verwendung von Vesikelpopulationen mit $d > 50$ μ m ($n = 4$, wobei n die Anzahl Messungen angibt) und einer Aperturöffnung $d = 7$ μ m konnte eine fast ausschliessliche Variation der Durchgangszeit bei fixierter Amplitudenänderungen in Abhängigkeit der Vesikelgrösse beobachtet werden. Es kann darauf geschlossen werden, dass Vesikel bei ihrem Durchgang durch die Aperturöffnung zu schlauchartigen Gebilden mit definiertem Durchmesser und geschlossener Oberfläche ausgezogen werden. Die sich in der Schlauchlänge widerspiegelnde Grösse der Vesikel ist als Amplitudendauer zugänglich.

Damit lässt sich, durch Analyse der für grosse Vesikel ($d_{\text{Vesikel}} \gg d_{\text{Apertur}}$) typischen Durchgangszeit und der für kleine Vesikel ($d_{\text{Vesikel}} \sim d_{\text{Apertur}}$) typischen Widerstandsamplitudenänderung, die grössenmässige Vesikelzusammensetzung einer Lösung bestimmen. Damit eröffnet dieses Verfahren ausserdem die Möglichkeit Populationen von Vesikeln und Zellen zu analysieren.

35 Beobachtung von Alamethicin Poren und nicotischen Acetylcholinrezeptoren

Zur Verifizierung der biologischen Funktions-

weise des erfindungsgemässen Systems wurde, nach der Ausbildung einer Membran über der Apertur in 85 mM KCl, Alamethicin (Endkonzentration im Puffer 0.1 µg/ml) zum Messkompartiment gegeben (R.B. Gennis (1989). Biomembranes: molecular structure and function. New York, Berlin, Heidelberg, Springer Verlag). Das Auftreten der für Alamethicin typischen Stromfluktuationen (Amplituden und Verweilzeiten), denen Leitfähigkeiten der Alamethicin-Poren von etwa 600 pS entsprechen, beweist die Funktionsfähigkeit und hohe Sensitivität des Systems (Fig. 12). Gleichfalls können Rezeptorproteine, z.B. der nAChR, über die - z.B. Ca²⁺ vermittelte - Fusion mit kleinen Vesikeln (small, medium and large unilamellare vesicles) in die Membran eingebracht und vermessen werden. Dazu wurde der nAChR gereinigt und entsprechend Schürholz in Vesikel rekonstituiert (Schürholz, T., J. Kehne, et al. (1992). "Functional reconstitution of the nicotinic acetylcholine receptor by CHAPS dialysis depends on the concentrations of salt, lipid, and protein." Biochemistry 31(21): 5067-77; Schürholz, T. (1996). "Critical dependence of the solubilization of lipid vesicles by the detergent CHAPS on the lipid composition. Functional reconstitution of the nicotinic acetylcholine receptor into preformed vesicles above the critical micellization concentration." Biophys Chem 58(1-2): 87-96). Diese Vesikel wurden zum Messkompartiment gegeben und durch Erhöhung der Ca²⁺ Konzentration der Probenkammer auf > 1 mM und, gegebenenfalls unterstützt durch den anschliessenden temporären Aufbau eines osmotischen Gradienten (siehe: Eray, Dogan et al. 1995 a.a.O.), mit der Membran fusioniert. In Abwesenheit von Agonisten wurden typische Rezeptoröffnungsereignisse aufgezeichnet (Fig. 13A), die nach Zugabe von Carbamylcholin (20 µM Endkonzentration) innerhalb kurzer Zeit (t < 100 sec) weitgehend verschwanden (Fig. 13B, Desensitisierung).

Die Bindung von Zellen

Bei Substitution der Vesikel durch biologische Zellen lassen sich diese analog zu den verwendeten Vesikeln positionieren und elektrisch charakterisieren.

- 5 Durch die Stützung der Zellmembran durch das Cytoskelett kommt es allerdings nicht automatisch zu einem Platzen der Zellen. Damit wird also nach Bindung der Zelle an die Chipoberfläche eine der Cell Attached Technik (CAT, Hamill, Marty et al. a.a.O., 1981) ähnliche Konfiguration
10 erreicht. Voraussetzung für eine rauschfreie Messung ist hier vor allem eine relativ glatte Membranoberfläche. So ist z.B. bei Verwendung von Pflanzenzellen unbedingt die Zellwand zu entfernen.

- Ausgehend von der CAT können, beispielsweise
15 durch elektrische Zerstörung des Membranpatches über der Apertur, elektrische Messungen über die gesamte Zellmembran durchgeführt werden (Whole Cell Recording). Die Zugabe von Porenbildnern, beispielsweise Amphotericin B oder Nystatin, zum Referenzkompartiment und folglich Permeabilisierung des Membranpatches über der Apertur kann
20 ebenfalls für Ganzzellmessungen verwendet werden (Perforated Patch Technik).

- Weiterhin ist, durch Lysis der Zelle, die Aufzeichnung von Einzelkanal Ereignissen in der sogenannten Inside-Out Konfiguration möglich, bei der die cytosolische Membranseite der Messlösung ausgesetzt ist.
25

Patentansprüche

1. Messanordnung mit mindestens zwei Elektroden (6, 9) und separierten, für die Aufnahme von Flüssigkeit geeigneten Kompartimenten, dadurch gekennzeichnet, dass sich zwischen zwei gegenüber befindlichen, in je mindestens ein Kompartiment hineinreichenden oder ein solches berührenden und beliebig geformten Elektroden (6, 9) ein Träger (1), befindet, der mindestens eine Apertur (3) enthält und jeweils mindestens 2 Kompartimente voneinander trennt.

2. Messanordnung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie auf einer Seite oder auf beiden Seiten des Trägers Mittel aufweist, die eine Flüssigkeitszugabe und/oder eine Flüssigkeitsspeicherung und/oder einen Flüssigkeitsaustausch und/oder die Zugabe von Zellen, Vesikeln, anderen biologischen Organellen oder Teilen derselben zwischen Träger und Elektrode ermöglichen.

3. Messanordnung gemäss Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Apertur (3) einen solchen Durchmesser aufweist, dass sich bei Existenz einer Spannungsdifferenz über dem Chip, vermittelt durch die Elektroden (6, 9), ein inhomogenes elektrisches Feld um die Apertur aufbaut, das mit Annäherung an die Apertur betragsmässig grösser wird und nahe der Apertur Vesikel, Zellen, Zellfragmente oder biologische Organellen elektrophoretisch auf diese zubewegen kann.

4. Messanordnung gemäss einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger (1) eine elektrisch geladene Oberfläche (5) aufweist, die attraktiv für biologische Membranen ist, oder eine Oberfläche (5) aufweist, die eine molekülspezifische oder durch multivalente Ionen vermittelte Bindung von Zellen, Vesikeln, Membranfragmenten oder biologischen Organellen daran gestattet.

5. Messanordnung gemäss einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger ein Silicium-Trägerchip mit aufgebrachteter Oxyd- oder Oxynitridschicht ist.

5 6. Messanordnung gemäss einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die elektrisch geladene Oberfläche (5) durch Modifikation, insbesondere mittels Polykationen und/oder Silanen, z.B. Aminosilanen, erzeugt wurde.

10 7. Messanordnung gemäss einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger eine Beschichtung (2) mit elektrisch geladener Oberfläche (5) aufweist.

15 8. Messanordnung gemäss einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger (1) vor der Modifikation seiner Oberfläche oder vor seiner unmittelbaren Benutzung in einem Sauerstoffplasma gereinigt und teilweise oder vollständig hydrophylisiert wurde

20 9. Messanordnung gemäss einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass jeweils eine Elektrode und mindestens eine Apertur (3) im Träger (1) über einen Kanal oder eine Kammer (8) in einem Abstandhalter (7, 10) unter Ausbildung eines offenen oder geschlossenen Kompartiments miteinander verbunden sind.

25 10. Messanordnung gemäss einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Kompartimente keine physische Begrenzung aufweisen.

30 11. Messanordnung gemäss einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass sie mehr als zwei Elektroden (6, 9) und mehr als eine Apertur (3) aufweist, derart, dass mindestens eine Elektrode, z.B. eine Referenzelektrode, der Messung über mehr als eine Apertur (3) dient.

35 12. Messanordnung gemäss einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger (1) mehr als eine Apertur (3) und doppelt so viele Elektroden (6, 9) wie Aperturen (3) aufweist, derart, dass sich je-

weils eine Apertur zwischen jeweils zwei Elektroden befindet.

13. Messanordnung gemäss einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Kompartimente
5 über Schläuche mit einem Pumpensystem oder einem Gerät, das auf hydrostatischer Druckbasis oder mittels eines Piezotropfenverfahrens resp. Tintenstrahlverfahrens oder mittels eines Kontakttransferverfahrens oder elektroosmotischen Verfahrens oder temperaturkontrollierten Verfahrens
10 arbeitet, gekoppelt ist, derart, dass Flüssigkeiten resp. Proben in beliebige Kompartimente zugegeben oder darin ausgetauscht werden können.

14. Messanordnung gemäss einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass sie mit einer Ap-
15 paratur zur Erzielung einer Probenauftrennung, insbesondere Kapillarelektrophorese (CE) und HPLC, gekoppelt ist und der Analyse der aufgetrennten Substanzen dient.

15. Messanordnung gemäss einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass sie mit Mitteln
20 versehen ist, die der kontinuierlichen oder regelmässigen Prüfung des Flüssigkeitsstands in den Kompartimenten dient, sowie mit Mitteln, für die Nachregelung entsprechend voreingestellter Füllparameter.

16. Messanordnung gemäss einem der Ansprüche
25 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberfläche (5) des Trägers (1) derart strukturiert ist, dass sich hydrophile und hydrophobe Bereiche ergeben, wobei sich die hydrophilen Bereiche vorzugsweise um die Apertur befinden.

17. Verfahren zur Positionierung von Zellen
30 oder Vesikeln mittels einer Messanordnung gemäss einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass Zellen resp. Vesikel oder andere biologische Organellen in den vorher mit Puffer gefüllten oder ungefüllten Zwischenraum zwischen Trennwand resp. Trägerchip und Elektrode
35 gegeben werden und zwischen beiden Elektroden eine elektrische Spannungsdifferenz, insbesondere in einem Bereich von -200 mV bis +200 mV, besteht, die zur Ausbil-

dung eines elektrischen Feldes führt, unter dessen Einfluss eine gerichtete Bewegung der Vesikel oder Zellen auf die Aperturöffnung stattfindet.

18. Verfahren gemäss Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Elektroden in einem solchen Abstand zueinander angebracht und die Kompartimente sowie die Apertur derart mit Puffern resp. Lösungen gefüllt werden, dass sich in einem sphärisch, aber beliebig geformten in die Kompartimentflüssigkeit hineinreichenden Raumgebiet um die Apertur Feldstärken $> 100 \text{ V/m}$ ergeben.

19. Verfahren zur elektrischen Analyse von natürlichen oder künstlichen Lipidmembranen, Vesikeln, Zellen oder biologischen Organellen, dadurch gekennzeichnet, dass die Membranen gemäss Anspruch 17 oder 18 positioniert werden, mit der Oberfläche (5) des Trägers (1) eine elektrisch dichte Verbindung über der Aperturöffnung (3) eingehen und eine Aufzeichnung des Membranwiderstandes mit gutem Signal-Rauschabstand gestatten.

20. Verfahren zur elektrischen Messung von Interaktionen an oder in natürlichen oder künstlichen Lipidmembranen, Vesikeln, Zellen oder biologischen Organellen, dadurch gekennzeichnet, dass die Membranen gemäss Anspruch 17 oder 18 erzeugt werden und dass die Messlösung oder die Referenzlösung oder beide Lösungen durch eine andere Lösung ausgetauscht werden oder eine zu analysierende Substanz zur Lösung mess- und/oder referenzseitig hinzugegeben wird.

21. Verfahren gemäss Anspruch 19 oder 20, dadurch gekennzeichnet, dass ein Porenbildner einem oder beiden Kompartimenten zugesetzt wird mit dem Ziel, die elektrische Leitfähigkeit resp. die Permeabilität der Membran gegenüber bestimmten Ionen zu erhöhen.

22. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 19 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass zu mindestens einem Kompartiment Proteoliposomen beliebiger Grösse gegeben werden mit dem Ziel, diese mit der Membran über der Apertur (3) zu fusionieren und damit beliebige darin enthal-

tene Membranproteine elektrischen oder optischen Messungen zugänglich zu machen.

23. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 19 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass Membranproteine nach dem Aufbau einer Membran über der Apertur (3) in diese eingebaut werden.

24. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 19 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass die über der Apertur (3) befindliche Membran optischen, insbesondere Fluoreszenzmessungen, zugänglich ist und diese daran ausgeführt werden.

25. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 19 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass eine Messanordnung oder ein Messsystem mit mehreren Aperturen (3) auf einem Träger verwendet wird, und dass Messungen über mindestens zwei Aperturen (3) sequentiell und/oder parallel erfolgen.

26. Verfahren gemäss Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass alle Elektroden auf einer Seite des Trägers (1) ein gemeinsames elektrisches Potential besitzen resp. zu einer Elektrode vereinigt werden.

27. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 19 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine Apertur der Messung verschiedener Membranparameter dienen kann, und dass mittels eines Pumpensystems, das über Schläuche mit beliebigen Kompartimenten verbunden ist, oder mittels eines Verfahren auf hydrostatischer Druckbasis oder mittels eines Piezotropfenverfahren resp. Tintenstrahlverfahren oder mittels eines Kontakttransferverfahren oder elektroosmotischen Verfahrens oder temperaturkontrollierten Verfahrens Flüssigkeiten resp. Proben in beliebigen Kompartimenten zugegeben oder ausgetauscht werden.

28. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 19 bis 27, dadurch gekennzeichnet, dass es direkt gekoppelt mit einem Probenauftrennungsprozess, insbesondere Kapil-

larelektrophorese (CE) und HPLC, durchgeführt wird und der Analyse der aufgetrennten Substanzen dient.

29. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 19 bis 28, dadurch gekennzeichnet, dass der Flüssigkeits-
5 stand in den Kompartimenten kontinuierlich oder regelmässig geprüft und entsprechend voreingestellten Füllparametern nachgeregelt wird.

30. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 19 bis 29, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberfläche (5)
10 des Trägers (1) derart strukturiert wird, dass sich hydrophile und hydrophobe Bereiche ergeben, wobei sich die hydrophilen Bereiche vorzugsweise um die Apertur befinden.

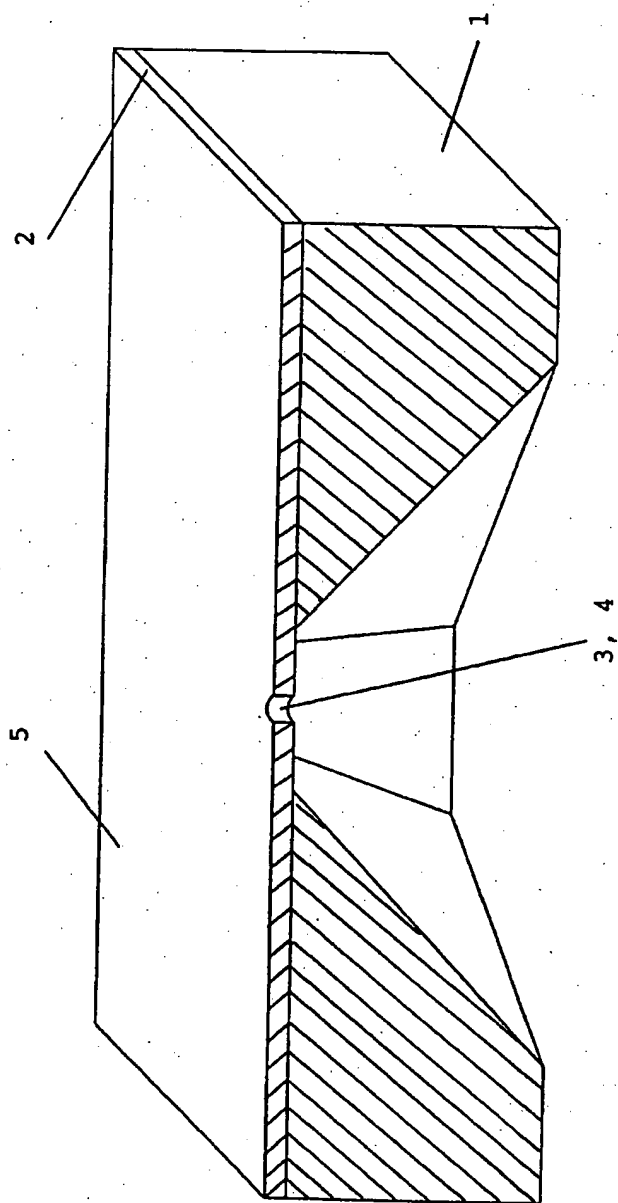
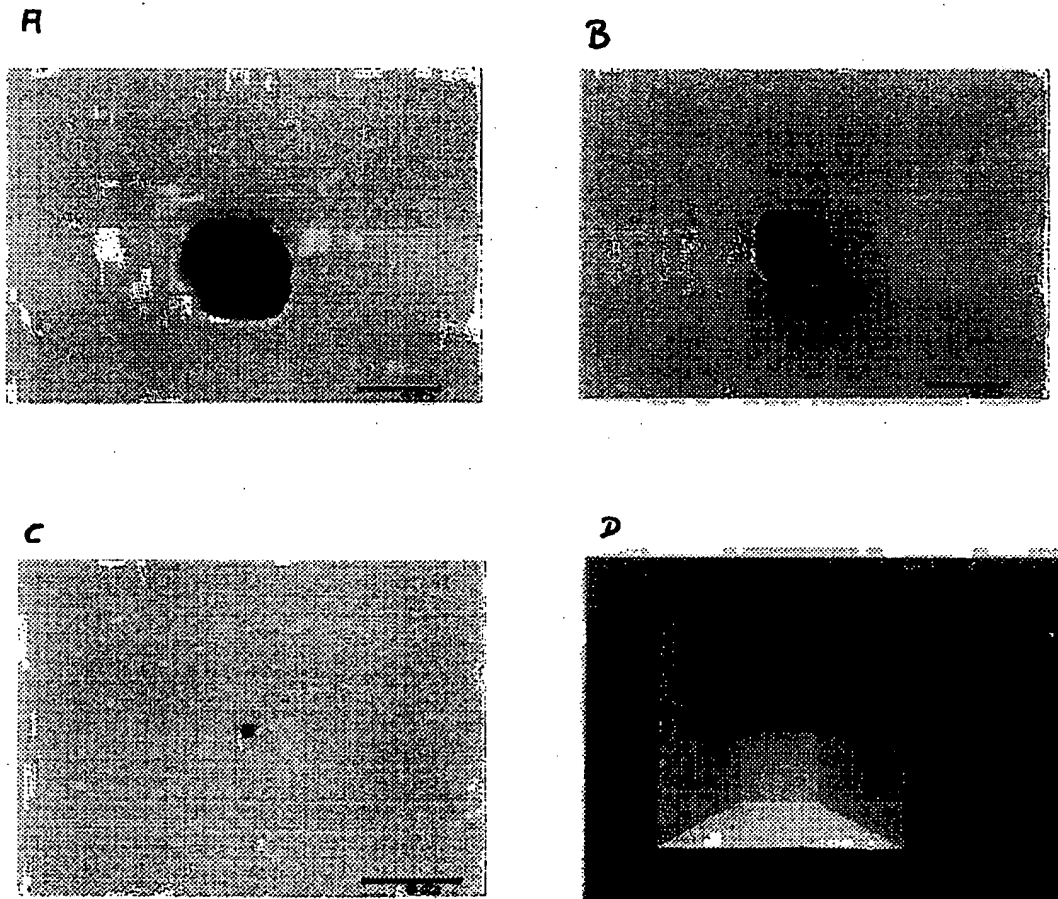
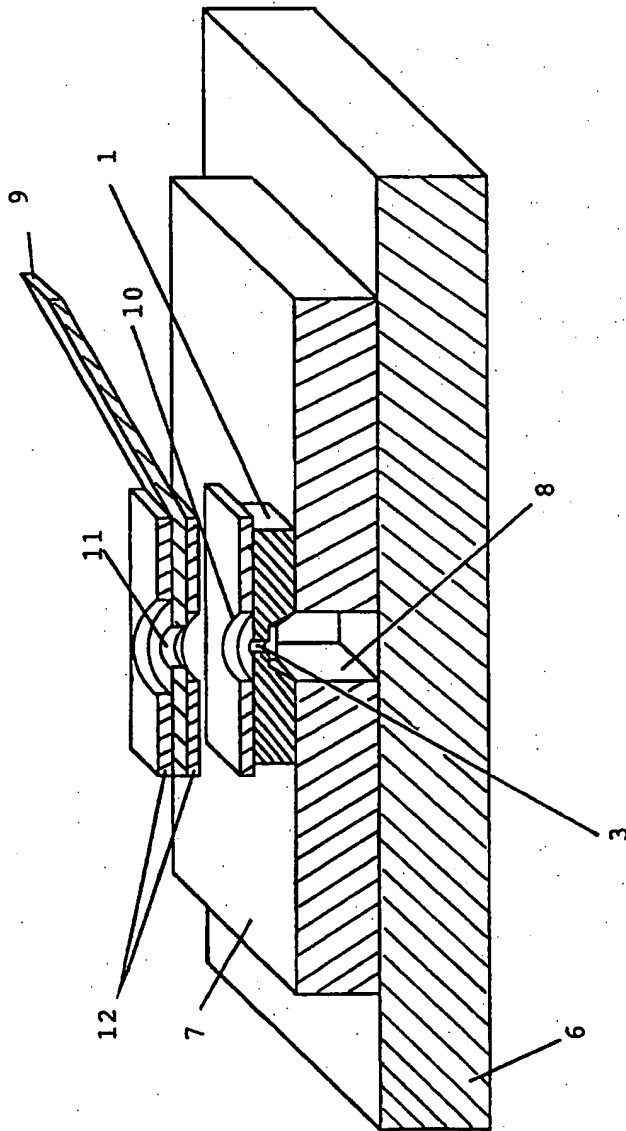


Figure 1



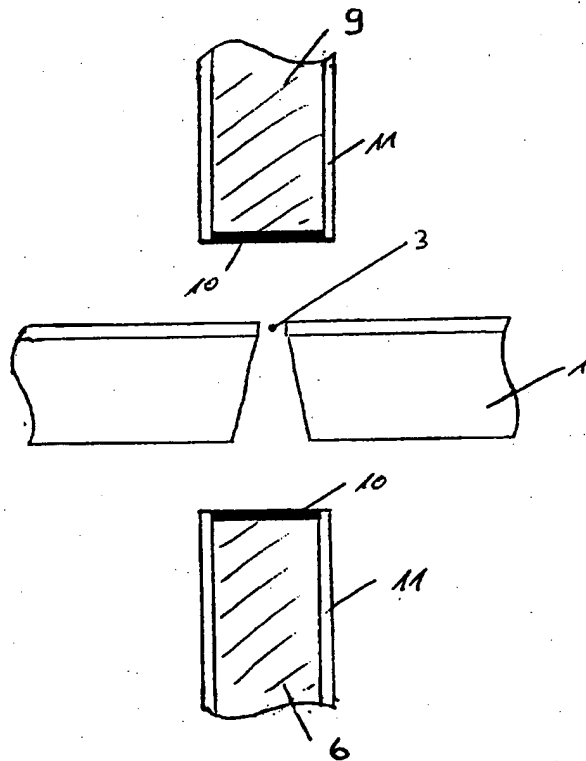
Figur 2

3/14

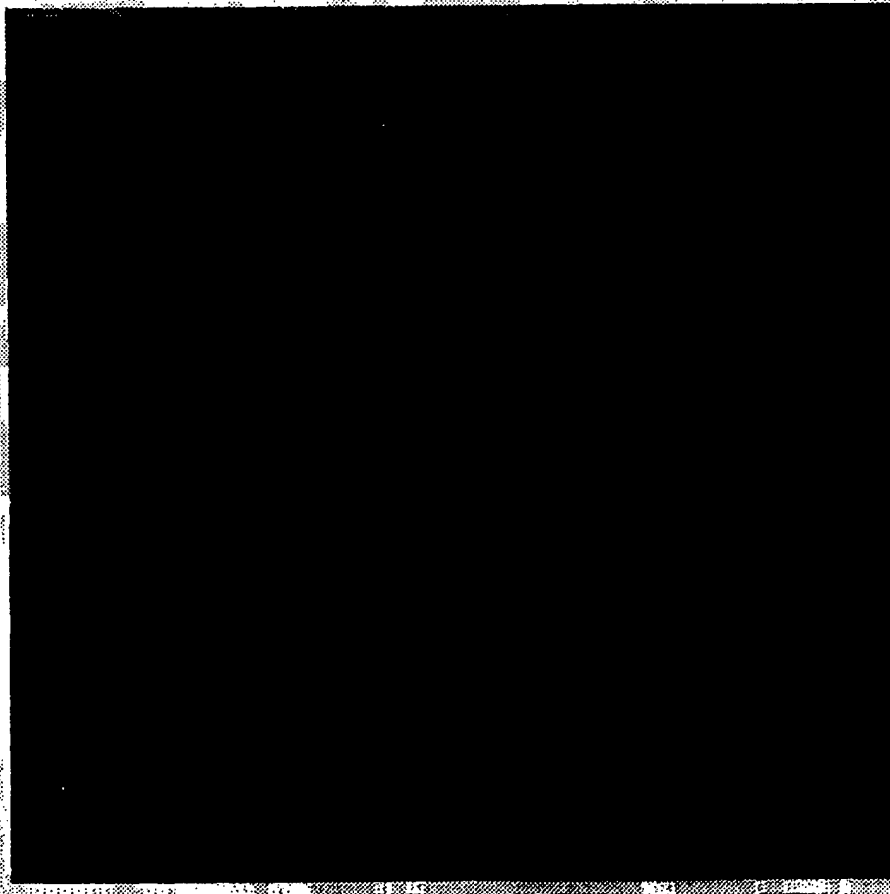


Figur 3

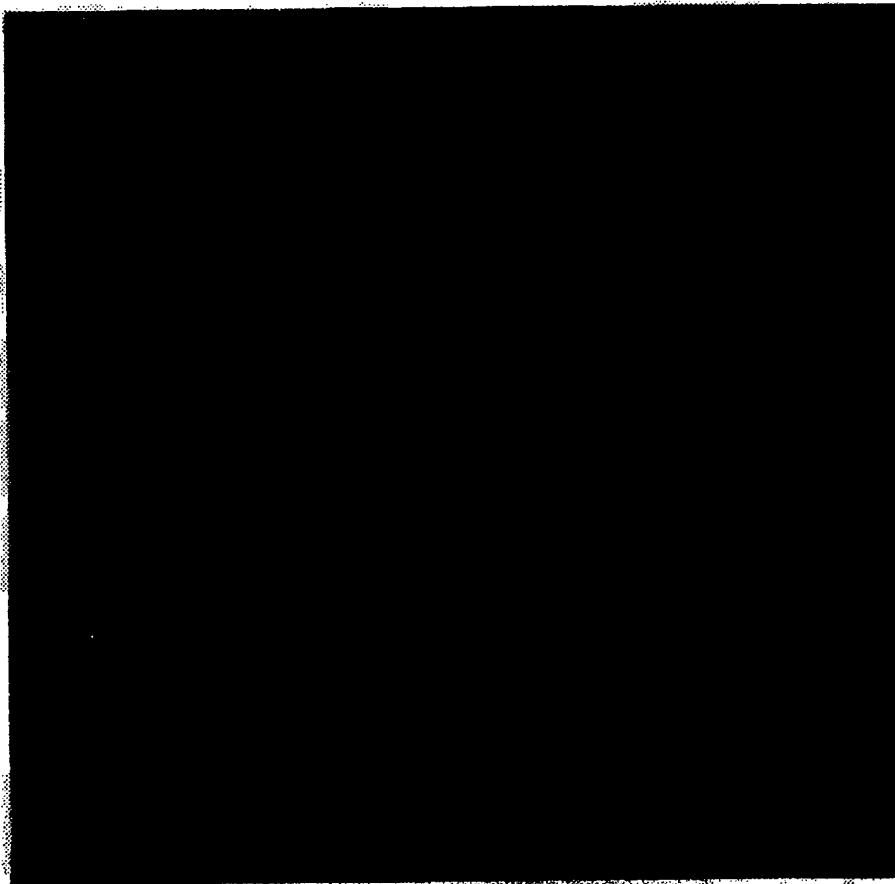
4/14



Figur 4



Figur 5

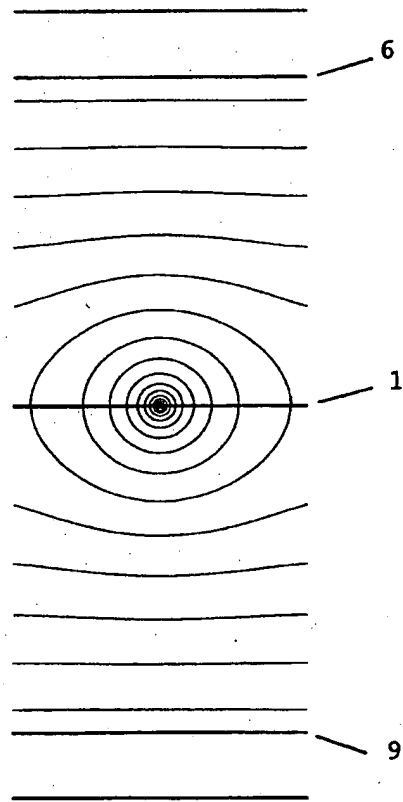


Figur 6

5/14
I

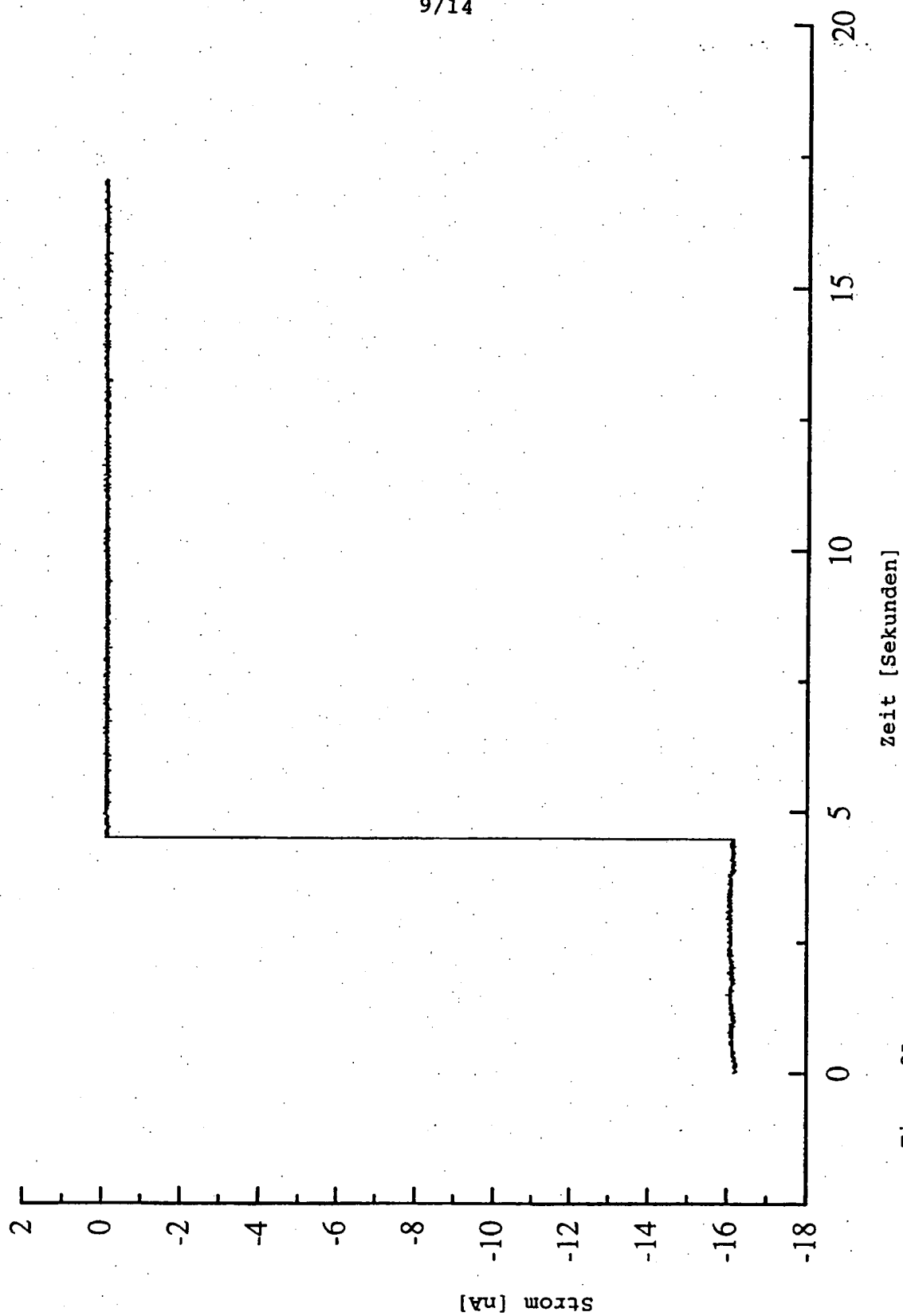


Figur 7

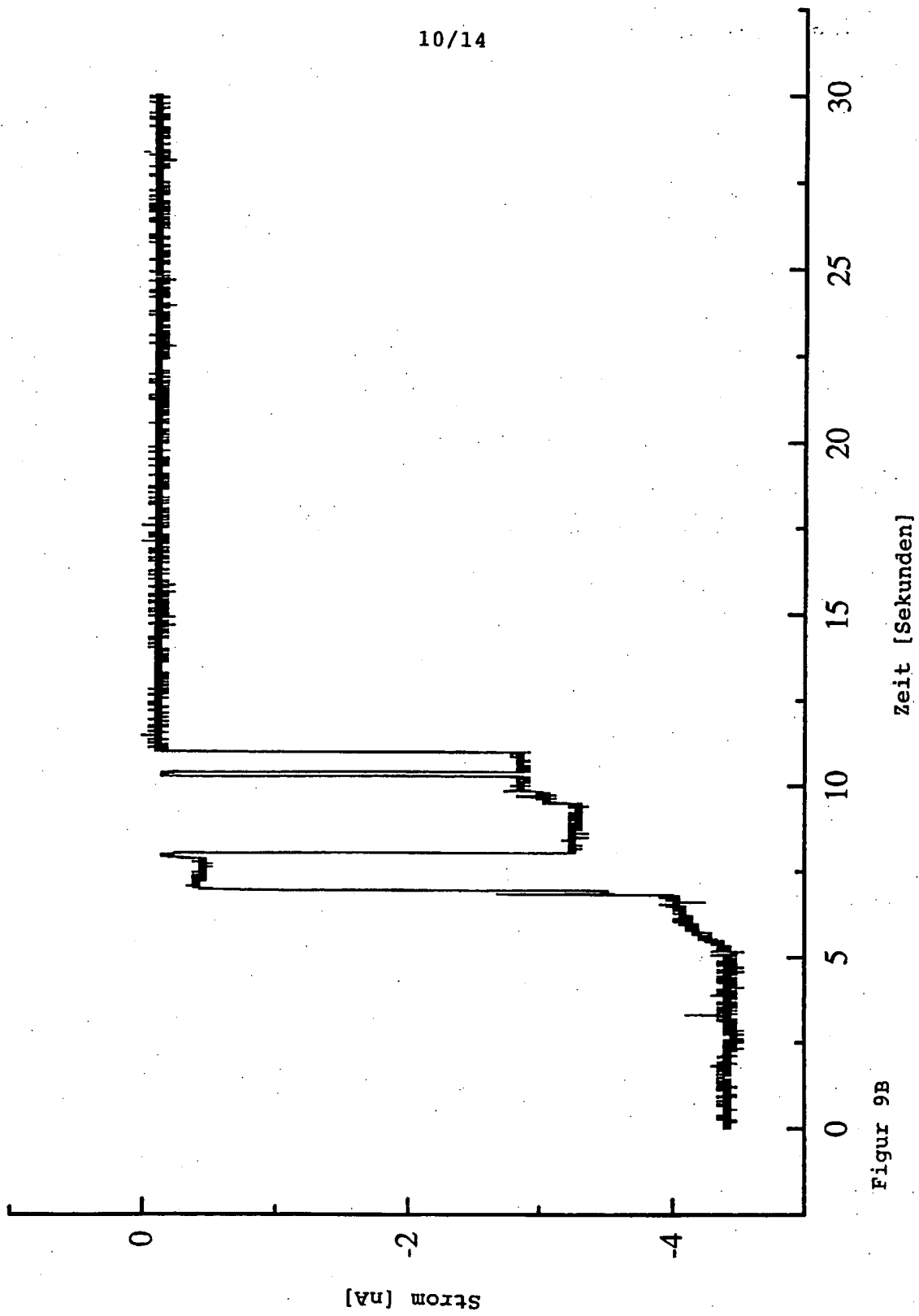


Figur 8

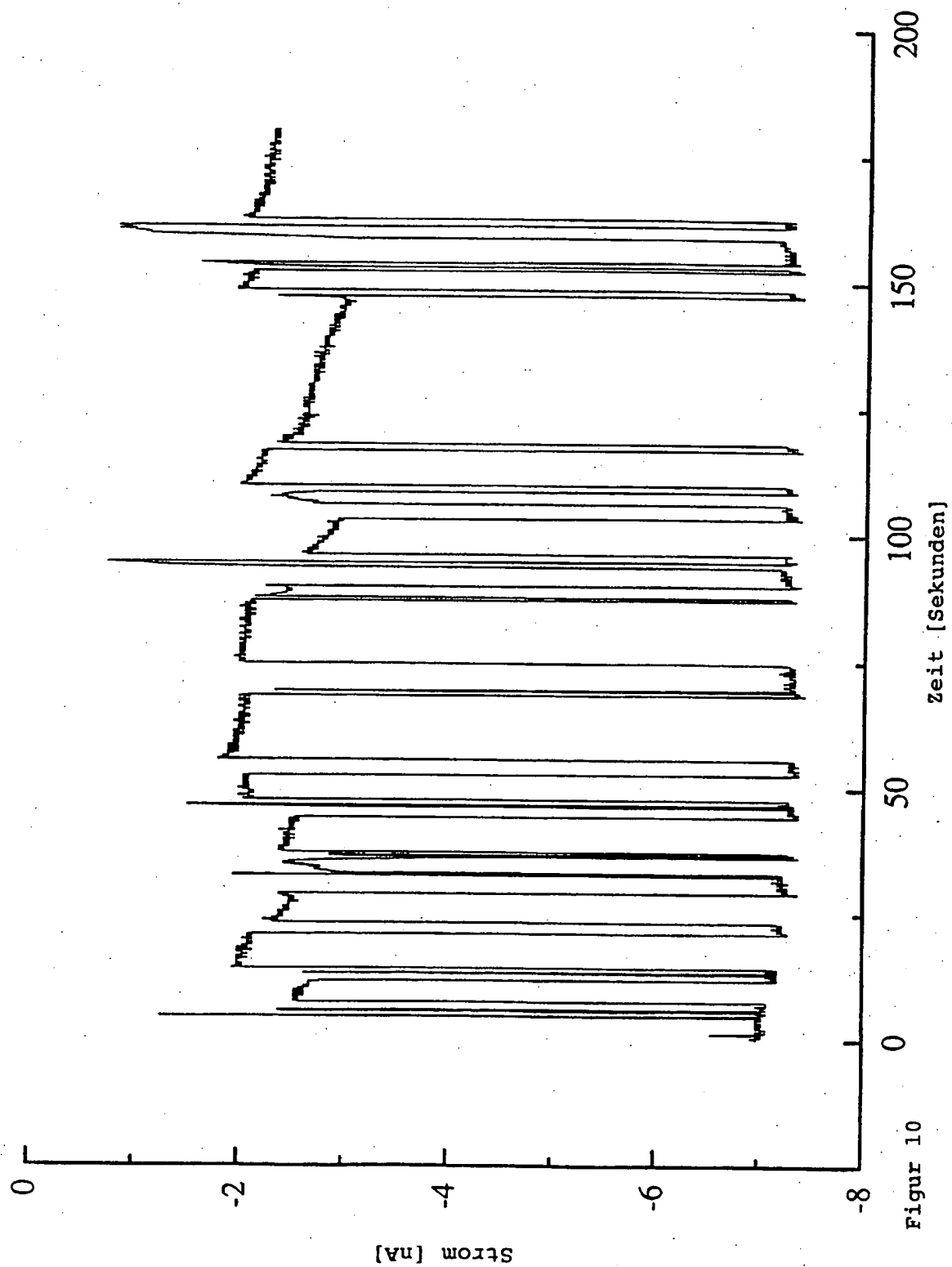
9/14

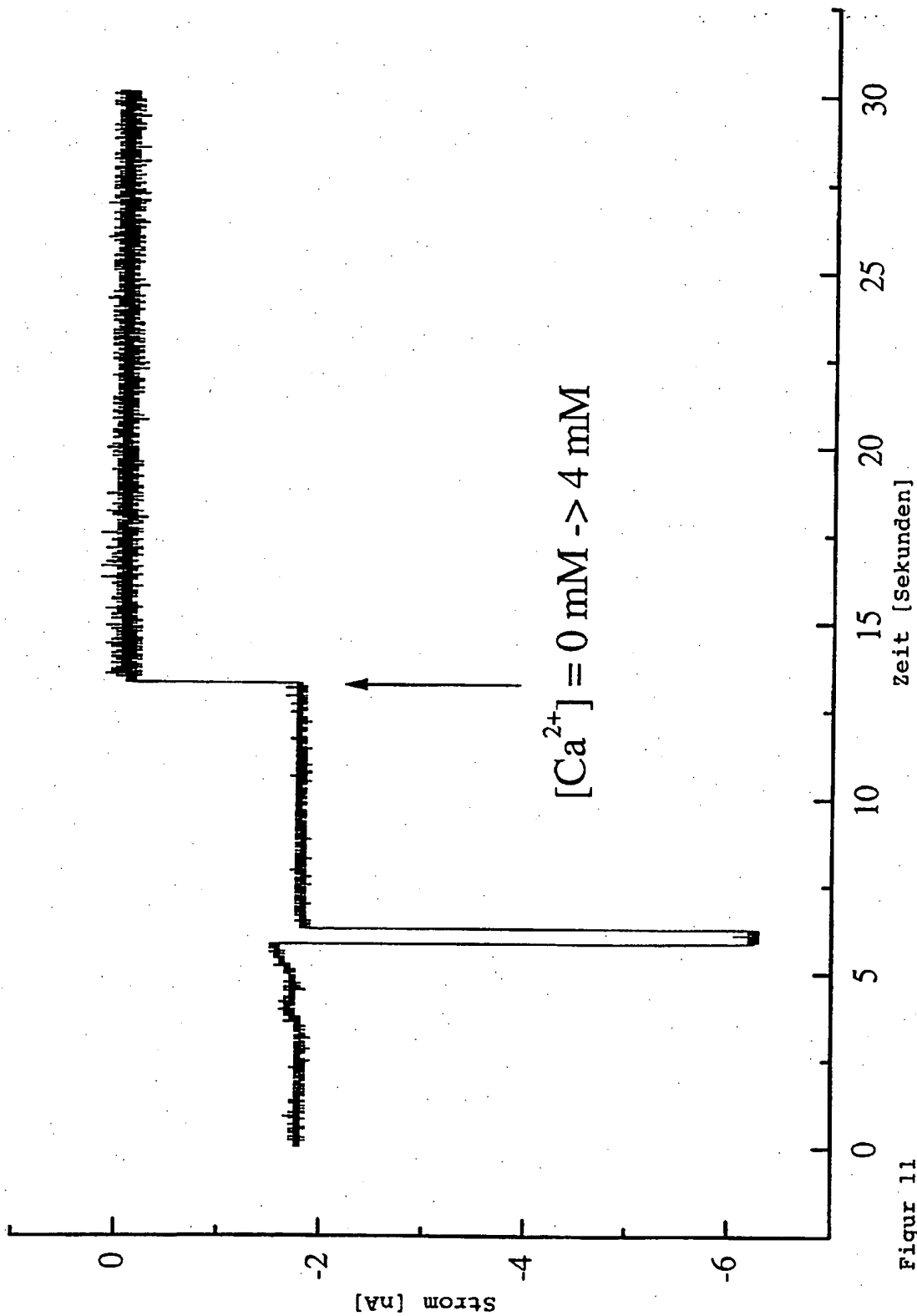


Figur 9A



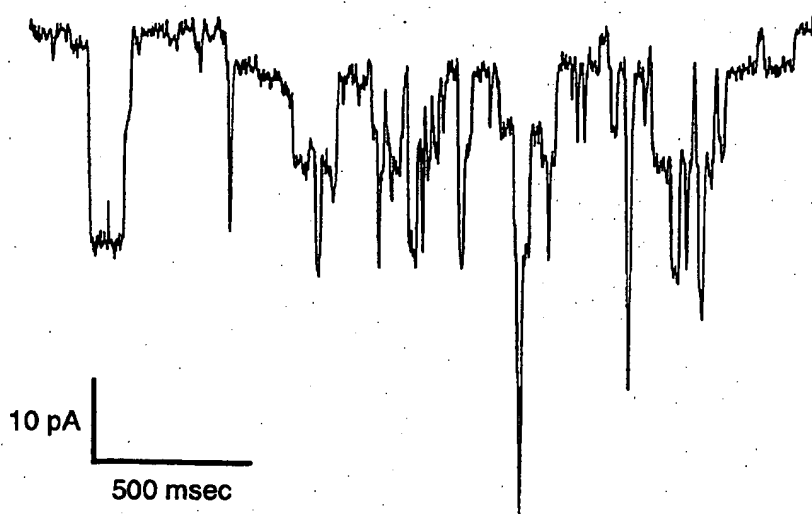
11/14





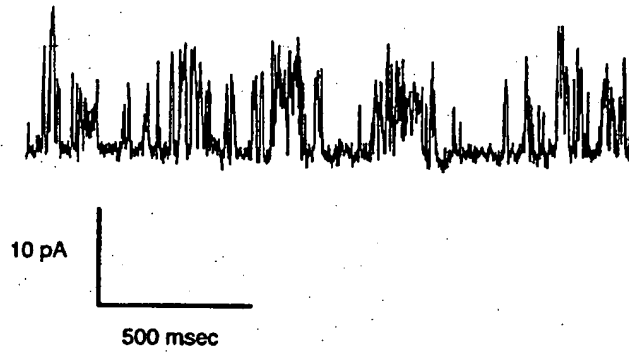
Figur 11

13/14

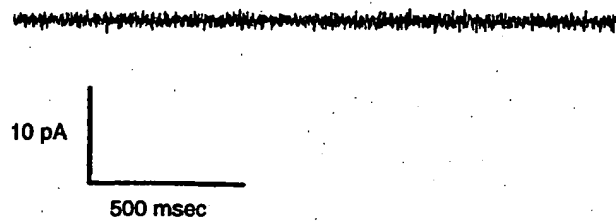


Figur 12

14/14



Figur 13A



Figur 13B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/IB 98/01150

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N33/487 C12M1/34 G01N33/483

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 055 799 A (COSTER, HANS ET AL.) 25 October 1977	1-3
Y	see the whole document	4
A	---	5-30
Y	EP 0 094 193 A (BAR-ILAN UNIVERSITY) 16 November 1983	4
A	see the whole document	1-3, 5-30
Y	WO 85 02201 A (NATIONAL PATENT DEVELOPMENT CORPORATION) 23 May 1985	4
A	see the whole document	1-3, 5-30
A	FR 2 659 347 A (INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE & S.N. ELF AQUITAINE) 13 September 1991 see the whole document	1, 17

	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

A document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 November 1998

Date of mailing of the international search report

09/11/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bosma, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/IB 98/01150

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.:
A	US 4 894 343 A (TANAKA) 16 January 1990 see the whole document -----	1,17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/IB 98/01150

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4055799 A	25-10-1977	DE 2502621 A	05-08-1976
		CH 594888 A	31-01-1978
		FR 2298797 A	20-08-1976
		JP 1297867 C	20-01-1986
		JP 51097495 A	27-08-1976
		JP 60013140 B	05-04-1985
EP 94193 A	16-11-1983	AU 562301 B	04-06-1987
		AU 1401483 A	17-11-1983
		BR 8302395 A	10-01-1984
		CA 1202870 A	08-04-1986
		CS 8303223 A	12-05-1989
		DK 190583 A	11-11-1983
		IN 159538 A	23-05-1987
		IN 168081 A	02-02-1991
		JP 1607661 C	13-06-1991
		JP 2034597 B	03-08-1990
		JP 59031685 A	20-02-1984
		SU 1776352 A	15-11-1992
		US 5506141 A	09-04-1996
		US 4729949 A	08-03-1988
		US 5272081 A	21-12-1993
		US 5310674 A	10-05-1994
		ZA 8303141 A	25-01-1984
WO 8502201 A	23-05-1985	AU 594641 B	15-03-1990
		AU 3672884 A	03-06-1985
		DE 3485462 A	27-02-1992
		DK 308385 A	05-09-1985
		EP 0162907 A	04-12-1985
		JP 61501126 T	12-06-1986
		US 5506141 A	09-04-1996
		US 5272081 A	21-12-1993
		US 5310674 A	10-05-1994
FR 2659347 A	13-09-1991	AU 656520 B	09-02-1995
		AU 7577091 A	10-10-1991
		CA 2078138 A	13-09-1991
		EP 0521979 A	13-01-1993
		WO 9113977 A	19-09-1991

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. al Application No

PCT/IB 98/01150

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4894343 A	16-01-1990	JP 2662215 B JP 63129980 A	08-10-1997 02-06-1988

PCT/IB 98/01150

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen

PCT/IB 98/01150

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 4 894 343 A (TANAKA) 16. Januar 1990 siehe das ganze Dokument -----	1,17

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/IB 98/01150

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 4055799 A	25-10-1977	DE 2502621 A	05-08-1976
		CH 594888 A	31-01-1978
		FR 2298797 A	20-08-1976
		JP 1297867 C	20-01-1986
		JP 51097495 A	27-08-1976
		JP 60013140 B	05-04-1985
EP 94193 A	16-11-1983	AU 562301 B	04-06-1987
		AU 1401483 A	17-11-1983
		BR 8302395 A	10-01-1984
		CA 1202870 A	08-04-1986
		CS 8303223 A	12-05-1989
		DK 190583 A	11-11-1983
		IN 159538 A	23-05-1987
		IN 168081 A	02-02-1991
		JP 1607661 C	13-06-1991
		JP 2034597 B	03-08-1990
		JP 59031685 A	20-02-1984
		SU 1776352 A	15-11-1992
		US 5506141 A	09-04-1996
		US 4729949 A	08-03-1988
		US 5272081 A	21-12-1993
		US 5310674 A	10-05-1994
		ZA 8303141 A	25-01-1984
WO 8502201 A	23-05-1985	AU 594641 B	15-03-1990
		AU 3672884 A	03-06-1985
		DE 3485462 A	27-02-1992
		DK 308385 A	05-09-1985
		EP 0162907 A	04-12-1985
		JP 61501126 T	12-06-1986
		US 5506141 A	09-04-1996
		US 5272081 A	21-12-1993
FR 2659347 A	13-09-1991	US 5310674 A	10-05-1994
		AU 656520 B	09-02-1995
		AU 7577091 A	10-10-1991
		CA 2078138 A	13-09-1991
		EP 0521979 A	13-01-1993
		WO 9113977 A	19-09-1991

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern: des Aktenzeichens

PCT/IB 98/01150

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 4894343 A	16-01-1990	JP 2662215 B	08-10-1997
		JP 63129980 A	02-06-1988

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.